

**Phänotypische, neurophysiologische und histopathologische Untersuchungen  
an einem Tiermodell für die septische Enzephalopathie**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität  
Jena**

**von Hanna Rupp**

**geboren am 15.10.1992 in Forchheim**

## **Gutachter**

**1. Prof. Dr.med Christian Geis, Universitätsklinikum Jena**

**2. Prof. Dr.rer.nat. Ralf Claus, Universitätsklinikum Jena**

**3. Prof. Dr.med. Claudia Sommer, Universitätsklinikum Würzburg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.06.2018**

## Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	6
2. Zusammenfassung.....	9
3. Einleitung .....	11
3.1 Sepsis und Ziele der Arbeit.....	11
3.2 Sepsis-Tiermodelle .....	12
3.3 Verbesserung der kognitiven Reserve durch Environmental Enrichment im Tiermodell.....	13
4. Material und Methoden.....	15
4.1 Tierhaltung .....	15
4.1.1 Allgemeines .....	15
4.1.2 Sepsis-Induktion und -Behandlung .....	16
4.1.3 Gruppeneinteilung und Environmental Enrichment .....	17
4.2 Verhaltenstestung .....	18
4.2.1 Allgemeines .....	18
4.2.2 Open Field-Test .....	18
4.2.3 Elevated-Plus-Maze .....	19
4.2.4 Morris Watermaze .....	19
4.2.5 Auswertung der Verhaltenstestung .....	21
4.3 Immunhistochemische Färbungen .....	22
4.3.1 Verwendete Lösungen.....	22
4.3.2 Gewebeentnahme .....	25
4.3.3 Immunhistochemische Färbungen.....	26
4.3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen .....	27
4.4 Golgi-Färbung .....	28
4.4.1 Anfertigen der Golgi-Färbung .....	28
4.4.2 Auswertung der Golgi-Färbung .....	29
4.5 Western Blot.....	30
4.5.1 Fragestellung und Theorie zur Durchführung des Western Blots .....	30
4.5.2 Probenisolation .....	30
4.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	31
4.5.4 Vorbereitung der Proben für den Western Blot .....	31
4.5.5 SDS-Page.....	32
4.5.6 Western Blot.....	32
4.5.7 Auswertung des Western Blots .....	33

4.6 Messung der Langzeitpotenzierung .....	34
4.6.1 Allgemeines .....	34
4.6.2 Präparation der Gewebeschnitte .....	34
4.6.3 Messung der Potentiale .....	35
4.6.4 Auswertung der LTP-Messungen .....	37
4.7 Statistische Auswertungen .....	37
5. Ergebnisse .....	37
5.1 Verhaltenstestung .....	37
5.1.1 Keine Veränderung der allgemeinen und lokomotorischen Aktivität im Open Field-Test durch EE .....	37
5.1.2 Vermindertes Angstverhalten durch EE im EPM .....	39
5.1.3 Verbesserung des räumlichen Lernens durch EE .....	39
5.1.4 Keine Verbesserung des Erinnerungsvermögens durch EE .....	41
5.2 Immunfluoreszenz .....	42
5.2.1 Zunahme der Mikroglia-Dichte in der Akutphase der Sepsis .....	42
5.2.2 Keine Unterschiede in der Dichte der Astrozyten .....	43
5.3 Golgi-Färbung .....	45
5.3.1 Erhöhung der Spine-Dichte durch EE .....	46
5.3.2 Kein Unterschied in der Spine-Länge zwischen den Versuchsgruppen .....	46
5.3.3 Erhöhte Dichte von mushroom-Spines durch EE .....	47
5.4 Western Blot – Keine Veränderung der ARC-Expression durch EE .....	49
5.5 LTP-Messungen .....	49
6. Diskussion .....	50
6.1 Beurteilung der Ergebnisse der Verhaltenstests .....	50
6.1.1 Beurteilung der Ergebnisse des Open Field-Tests .....	50
6.1.2 Beurteilung der Ergebnisse des EPM .....	51
6.1.3 Beurteilung der Ergebnisse des MWM .....	52
6.2 Beurteilung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen .....	54
6.2.1 Beurteilung der IBA-Färbung .....	54
6.2.2 Beurteilung der GFAP-Färbung .....	55
6.3 Beurteilung der Ergebnisse der Golgi-Färbung .....	56
6.4 Beurteilung der Ergebnisse des Western Blots .....	59
6.4.1 Beurteilung der Ergebnisse des ARC-Antikörpers .....	59
6.5 Beurteilung der LTP-Messungen .....	61
6.6 Schlussfolgerung und Ausblick .....	62
7. Literaturverzeichnis .....	65

8. Anhang .....	72
8.1 Danksagung .....	72
8.2 Abbildungsverzeichnis .....	73
8.3 Tabellenverzeichnis .....	74
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung .....	75

# 1. Abkürzungsverzeichnis

## A

AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid
APS	Ammoniumpersulfat
ARC	activity regulated cytoskeleton associated protein
AZ	Aktenzeichen

## B

BDNF	brain-derived neurotrophic factor
------	-----------------------------------

## C

CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CASP	colon ascendens stent peritonitis
CLP	cecal ligation and puncture
CSS	clinical severity score for evaluation of the clinical status

## D

DAPI	Diamino-Phenylindol
dest.	destillata

## E

ECL	enhanced chemoluminescence
EE	Environmental Enrichment
EPM	Elevated Plus-Maze
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential

## F

Fab	fragment antigen-binding
-----	--------------------------

## G

GAP-43	growth-associated protein 43
GDNF	glial cell-line derived neurotrophic factor

## **H**

HCl            Salzsäure

## **I**

i.v.            intravenös

IBA            ionized calcium-binding adaptor molecule 1

IEG            immediate early genes

IgG            Immunglobulin G

IL             Interleukin

iNOS           induzierbare Stickstoffoxid-Synthetase

## **K**

KCl            Kaliumchlorid

## **L**

LPS            Lipopolysaccharid

LTP            Langzeitpotenzierung

## **M**

MgSO<sub>4</sub>        Magnesiumsulfat

## **N**

n.s.            nicht signifikant

NaCl           Natrium-Chlorid (0,9%ig)

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>      Natriumdihydrogenphosphat

NaHCO<sub>3</sub>       Natriumhydrogencarbonat

NaOH          Natriumhydroxid

NGF           nerve growth Faktor

NMDA          N-Methyl-D-Aspartat

NO             Stickstoff-Oxid, Nord-Ost

NW             Nord-West

## **P**

PAMP pathogen associated molecular patterns

PBS phosphate-buffered saline

PCI peritoneal contamination and infection

PFA Paraformaldehyd

## **R**

rcf relative Zentrifugalbeschleunigung

ROS reaktive Sauerstoff-Spezies

rpm Rotationen pro Minute

## **S**

SDS Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE Natriumdodecyl-Polyacrylamid-Gel

SO Süd-Ost

SW Süd-West

## **T**

TBS tris-buffered saline

TBS-T tris-buffered-saline with Tween20

TEMED Tetramethylethyldiamin

TLR toll-like Rezeptoren

TNF Tumor-Nekrose-Faktor

Tris Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TrKB tropomyosin related kinase B



## 2. Zusammenfassung

Die Sepsis stellt mit einer Prävalenz von 116/100.000 Einwohnern und einer Mortalitätsrate von 30% eine der größten Herausforderungen in der Intensivversorgung dar. Rund ein Viertel der Überlebenden leidet an andauernden kognitiven Schäden, die mit denen der Alzheimer-Erkrankung vergleichbar sind. Dies schränkt die Patienten in ihrem Alltag stark ein und geht mit einem Verlust an Lebensqualität einher.

Ziel vorliegender Arbeit ist es, kognitives Training, sog. Environmental Enrichment (EE), als Therapiemöglichkeit der kognitiven Defizite nach sepsisassoziierter Enzephalopathie am Mausmodell zu untersuchen. Beim EE handelt es sich um ein etabliertes Modell für kognitives Training, bei dem die Tiere in größeren Gruppen in geräumigeren, mit Tunnelsystemen, Rückzugsmöglichkeiten und sensorisch stimulierenden Spielzeugen ausgestatteten Käfigen untergebracht werden. Dies wirkt aktivierend auf die Tiere, sie werden motorisch, sensorisch und sozial gefordert. Zur Sepsisinduktion wurden den Versuchstieren gewichtsadaptiert humane Fäzeskulturen intraperitoneal injiziert (peritoneal contamination and infection (PCI)-Modell), anschließend wurden die Tiere zehn Tage antibiotisch behandelt. 14 Tage nach Sepsisinduktion wurden die überlebenden Tiere randomisiert und für sechs Wochen in Enrichment- oder Standardkäfigen untergebracht. Als Kontrolle diente eine Gruppe gesunder Tiere in Standardkäfigen.

Acht Wochen nach Sepsisinduktion wurden die Tiere einer Verhaltenstestung unterzogen. Im Open Field-Test, einem Test, der die allgemeine lokomotorische Aktivität der Tiere zeigt, konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gezeigt werden. Im Elevated-Plus-Maze, einem Test für Angstverhalten, verbrachten die Tiere der PCI+Enrichment-Gruppe signifikant mehr Zeit im offenen, ungeschützten Arm der Versuchsanordnung als die Tiere der PCI+Standard-Gruppe. Diese verbrachten signifikant mehr Zeit im geschlossenen, dunklen Arm der Apparatur. Dies zeigt, dass das Angstverhalten der Tiere durch EE verbessert werden konnte. Im Morris Watermaze, einem Verhaltenstest, der Aussagen über räumliche Lern- und Merkfähigkeit erlaubt, zeigte sich, dass die Tiere der Enrichment-Unterbringung das Auffinden einer im Wasserbecken verborgenen Plattform signifikant schneller erlernten. Jedoch erinnerten die Tiere der Gruppe PCI+Enrichment die Lokalisation der Plattform nach acht bzw. 15 Trainingstagen nicht besser. Es konnte also eine

verbesserte Lernfähigkeit durch EE gezeigt werden, der Nachweis einer signifikant verbesserten Merkfähigkeit gelang allerdings nicht.

Um eine zentralnervöse Entzündungsreaktion durch die Sepsisinduktion nachzuweisen wurden Mikroglia und Astrozyten im Gewebe mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Es zeigte sich dabei in frühen Stadien drei Tage nach Sepsisinduktion eine signifikant erhöhte Dichte von Mikroglia im Vergleich zu gesunden Tieren, acht Wochen nach Induktion waren diese Veränderungen nicht mehr nachweisbar. Bei den Astrozyten waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Die peritoneale Sepsisinduktion vermag also eine Immunreaktion mit Aktivierung ortständiger Immunzellen im Gehirn auszulösen.

Ein Teil des Gewebes der Tiere wurde im Anschluss an die Verhaltenstests zur Analyse dendritischer Spines mittels Golgi-Färbung genutzt. Dabei zeigte sich in der Gruppe der Enrichment-Tiere eine signifikante Erhöhung der Spine-Dichte und der Anzahl von „mushroom“-Spines. Diese morphologischen Veränderungen deuten auf eine gesteigerte und stabilere synaptische Transmission durch EE hin.

Ein anderer Teil des Gewebes wurde zur quantitativen Analyse des synaptischen Proteins ARC (activity regulated cytoskeletal associated protein) mittels Western Blot herangezogen. ARC ist ein Schlüsselprotein der Langzeitkonsolidierung von Gedächtnisinhalten. Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

Bei der elektrophysiologischen Messung der LTP im Hippocampus konnten aufgrund methodischer Probleme nicht hinreichend Messungen generiert werden, die den Qualitätskriterien des Experiments entsprachen, um eine quantitative Analyse vornehmen zu können. Zum Abschluss des Experiments war die Methode aber hinreichend etabliert, um zukünftig auch Untersuchungen zu Veränderungen der synaptischen Plastizität mittels LTP durchführen zu können.

In der Zusammenschau geben die Ergebnisse vorliegender Arbeit deutliche Hinweise auf die Wirksamkeit des EEs als Therapiemöglichkeit der kognitiven Defizite nach durchlebter Sepsis. Ziel zukünftiger Arbeiten sollte es sein, die molekularen Grundlagen dieser Veränderungen zu erfassen um gezielte Therapien zur Verbesserung der synaptischen Plastizität nach Sepsis zu entwickeln. Das bereits teilweise in der Rehabilitation verwendete kognitive Training nach Sepsis sollte standardisiert angewendet und wissenschaftlich evaluiert werden.

### 3. Einleitung

#### 3.1 Sepsis und Ziele der Arbeit

Als Sepsis bezeichnet man eine lebensbedrohliche Organdysfunktion infolge einer Infektion, bei der es im Körper zu einer dysregulierten, generalisierten Entzündungsreaktion kommt (Singer et al. 2016). Mit einer Prävalenz von 116/100.000 Einwohnern für die Sepsis und einer Mortalitätsrate von etwa 30% (Engel et al. 2007) stellt die Erkrankung derzeit eine der größten Herausforderungen in der Intensivversorgung von Patienten dar. Aufgrund der alternden Gesellschaft ist in den kommenden Jahren und Jahrzehnten zudem mit einem weiteren Anstieg der Prävalenz zu rechnen. Doch nicht nur die hohe Mortalität in der Akutphase der Sepsis stellt Mediziner und Forscher vor eine Herausforderung; auch die Langzeitfolgen der Erkrankung können bisher nur unzureichend behandelt werden. Bei einem Viertel der Überlebenden einer Sepsis kommt es in Folge der Erkrankung zu Einbußen der kognitiven Leistungsfähigkeit, die mit denen bei der Alzheimer-Erkrankung vergleichbar sind und die Patienten in ihrer Selbstständigkeit im täglichen Leben schwer beeinträchtigen (Pandharipande et al. 2014, Hopkins und Herridge 2006). Eine Alzheimer-Erkrankung tritt zudem im Verlauf des Lebens häufiger auf, wenn zuvor eine Sepsis durchgemacht wurde (Kao et al. 2015). Bisher besteht keine wirksame und überprüfte Therapie, die Verschlechterung der kognitiven Fähigkeiten zu verbessern oder zu verhindern. Es ist daher notwendig, die Behandlungsmöglichkeiten auf diesem Gebiet weiter zu untersuchen, um die Lebensqualität vieler Patienten nach überstandener Sepsis zu erhöhen.

In der Vergangenheit konnte in der Erforschung der Alzheimer-Erkrankung bereits gezeigt werden, dass ein körperlich und geistig aktiver Lebensstil das klinische Manifestationsalter der Erkrankung nach hinten verschieben und das Voranschreiten verzögern kann (Pope et al. 2003). Für die Forschung im Tiermodell wird als Korrelat dieses Lebensstils das Environmental Enrichment (EE) verwendet (siehe Kapitel 3.3). Die bisherige Alzheimer-Forschung mit diesem Modell konnte bereits zeigen, dass sich die Ergebnisse erkrankter Tiere im Angstverhalten, beim räumlichen Lernen sowie in der Gedächtnisfunktion verbesserten (Gortz et al. 2008). Es wurde deshalb die Hypothese gestellt, dass auch bei Versuchstieren, die in der Rehabilitationsphase der Sepsis einer anregenden, kognitiv fordernden und aktivierenden Umgebung

ausgesetzt werden, eine Verbesserung in kognitiven Leistungstests erreicht werden kann.

Ziel vorliegender Arbeit ist es, die Auswirkungen des EEs in der Genesungsphase der Sepsis auf die kognitive Leistungsfähigkeit von Versuchstieren zu untersuchen, die nach Infektion durch das PCI (peritoneal contamination and infection) -Modell eine schwere Sepsis durchlitten haben. Die Verhaltenstests werden ausgewählt, um Aufschluss über das Angstverhalten, Lern- und Erinnerungsvermögen zu geben. Des Weiteren sollen anhand von Analysen der Anzahl und Morphologie von dendritischen Spines mittels Golgi-Färbung sowie durch Nachweis des synaptischen Proteins ARC (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) mittels Western Blot als Korrelat der synaptischen Funktion Hinweise auf zugrundeliegende pathophysiologische Zusammenhänge untersucht werden. Ein weiterer Abschnitt widmet sich der Analyse von Unterschieden in der Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten im Hippocampus in der akuten und chronischen Phase der Sepsis, wodurch Aussagen über die Immunreaktion in dieser Gehirnregion gemacht werden können und somit weitere Hinweise auf die Entstehungsursache der kognitiven Leistungsverschlechterung nach durchgemachter Sepsis gewonnen werden können. Zudem soll untersucht werden, ob sich eine eventuelle Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit auch elektrophysiologisch als Steigerung der LTP als Parameter der synaptischen Plastizität im Hippocampus messen lässt.

### 3.2 Sepsis-Tiermodelle

Die hohe Prävalenz der Sepsis, die hohe Mortalität sowie die bisher nur unzureichenden Therapiemöglichkeiten machen es notwendig, die Pathomechanismen und therapeutischen Optionen der Erkrankung im Tiermodell zu erforschen (Vincent et al. 2014). Über die Jahre wurden dafür eine Reihe von Modellen entwickelt. Lange Zeit waren die Bolusinjektion von LPS (Lipopolysaccharid) oder die i.v.- Injektion von Bakterienkulturen verbreitete Methoden der Sepsis-Simulation, doch die teilweise vielversprechenden Ergebnisse der Tierstudien konnten in der klinischen Erprobung am Patienten nicht bestehen (Buras et al. 2005). Den Grund dafür fand man in der zu starken Vereinfachung der Krankheitsentstehung in den bekannten Tiermodellen, die es nicht schafften, die Komplexität der Pathomechanismen bei der Entstehung einer Sepsis sowie deren zweiphasigen Verlauf in frühe hyperdynamische und späte hypodynamische Phase des Kreislaufs abzubilden (Parker und Parrillo

1983). Die Langzeitfolgen der Sepsis konnten aufgrund der nur kurz andauernden Krankheitsphase und des in den Modellen fehlenden Aspekts der Chronifizierung von Infektionen bei ausgedehntem Akutstadium ebenso wenig erfolgreich untersucht werden. Für meine Studien verwendete ich daher das neuere PCI-Modell, das gegenüber den bisherigen Methoden eine Reihe von Vorteilen bietet (Gonnert et al. 2011): die Stuhl-Suspension wird in großer Menge hergestellt und steht somit für eine Vielzahl von Versuchsreihen zur Verfügung, bei denen die Erregerart, die Last der Infektion und die Mortalitätsrate vergleichbar sind. Dies stellt gegenüber dem CLP (cecal ligation puncture) Modell und dem CASP (colon ascendens stent peritonitis) -Modell einen Vorteil dar, da hier die durch die Perforation(en) penetrierende Menge an Stuhl nicht kontrolliert werden kann und sich die Darmflora zwischen den Versuchstieren unterscheidet. Zudem ist bei dem PCI-Modell das technische Vorgehen mit der intraperitonealen Injektion einfach durchzuführen. Es muss keine Operationstechnik erlernt werden und eine Abhängigkeit des Ergebnisses von der Erfahrung des Operators ist nur in geringerem Maße zu erwarten als bei den operativen CLP- und CASP-Modellen. Die Induktion der septischen Peritonitis erfolgt durch eine Suspension aus humanen Fäzeskulturen. Das Erregerspektrum ist somit groß und umfasst sowohl aerobe als auch anaerobe Keime und entspricht somit dem natürlichen Erregerspektrum komplizierter intraabdomineller Infektionen (Solomkin et al. 2010). Da Erreger selbst und nicht nur Bestandteile wie LPS injiziert werden, spielt sich im Körper ein natürlicher Infektionsverlauf ab, wodurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Realität erhöht wird und durch das chronische Vorhandensein von Erregern im Körper die Langzeitfolgen der Sepsis besser untersucht werden können. Unter Verwendung des PCI-Modells in vorliegender Arbeit sind also Ergebnisse zu erwarten, die am ehesten auf das Patientengut im klinischen Alltag übertragbar sind.

### 3.3 Verbesserung der kognitiven Reserve durch Environmental Enrichment im Tiermodell

Die kognitive Leistungsfähigkeit des Menschen hängt nicht nur von seiner genetischen Ausstattung, sondern in wesentlichem Maße auch von Umweltfaktoren ab (Harati et al. 2013). Eine Umgebung, die von wechselnden, neuen Reizen geprägt ist und das Individuum zu ständiger Anpassung an neue Herausforderungen zwingt, kann dazu

beitragen, die geistige Leistungsfähigkeit bis ins hohe Alter zu erhalten. Zudem kann dies protektiv gegenüber Erkrankungen wirken, die mit einer Reduktion der kognitiven Fähigkeiten einhergehen beziehungsweise deren Progression verzögern.

Um den Einfluss einer stimulierenden Umgebung auf den Verlauf von Demenzerkrankungen im Tiermodell zu untersuchen, hat sich in der Wissenschaft das Modell des EE etabliert (Nithianantharajah und Hannan 2006). Die Versuchstiere werden dabei einer im Vergleich zur Standardhaltung stimulierenden Umgebung ausgesetzt, die sie vor allem somatosensorisch, motorisch und sozial fordert. Erreicht wird dies, indem die Tiere in im Vergleich zur Standardhaltung des jeweiligen Labors größeren Käfigen gehalten werden. Die Tierzahl im Käfig wird erhöht, wodurch die sozialen Interaktionen zwischen den Tieren verstärkt werden. Den Käfigen wurde zudem eine Reihe von Spielzeugen zugesetzt. Dabei handelt es sich vor allem um Rohre, die von den Tieren als Tunnelsysteme genutzt werden, und Häuschen und Nestmaterial, um Rückzugsmöglichkeiten anzubieten. Laufräder werden eingesetzt, um die motorische Aktivität der Tiere anzuregen und zu steigern. Je nach Protokoll täglich bis wöchentlich werden die Spielzeuge im Käfig zudem neu angeordnet, um die Umgebung für die Tiere weiterhin interessant zu gestalten, ihren Erkundungsdrang aufrecht zu erhalten und sie zu einer Anpassung an die veränderten Gegebenheiten zu zwingen.

Für eine Vielzahl von neurologischen Erkrankungen, die mit einer Einschränkung der kognitiven Fähigkeiten des Patienten einhergehen, konnte bereits gezeigt werden, dass EE den Krankheitsverlauf im Tiermodell günstig beeinflussen kann. Vorrangig seien hier Tiermodelle für den Morbus Alzheimer genannt, die häufigste Form der Demenzerkrankungen. Tiere, die einem EE ausgesetzt waren, konnten im Krankheitsverlauf im Morris Watermaze (MWM) bessere Ergebnisse erzielen als Tiere der Standardhaltung (Jankowsky et al. 2005). Als Mechanismus hierfür gilt zum einen die gesteigerte Neurogenese im Hippocampus, die durch eine erhöhte Expression des BDNF (brain-derived neurotrophic factor) vermittelt wird (Rossi et al. 2006, Garthe et al. 2016), aber auch durch die gesteigerte Expression anderer Neurotrophine wie NGF (nerve growth factor) und GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor) (Pham et al. 2002). Insbesondere aktiviert BDNF auch den TrkB (tropomyosin-related kinase B) -Rezeptor, welcher den Transport von Transmembranrezeptoren in Axonterminalen und dendritischen Spines vermittelt. Somit kann über den vermehrten Einbau von AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid) -Rezeptoren die

Erregbarkeit von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) -Rezeptoren erhöht werden und Einfluss auf die Stabilität einer synaptischen Verbindung genommen werden (Spencer-Segal et al. 2011). Elektrophysiologisch ist dies dann als Zunahme der Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus, z.B. entlang der Schaffer-Kollateralen nachzuweisen (siehe hierzu Kapitel 4.6.1). Auch konnte eine gesteigerte Expression von anderen Proteinen gezeigt werden, die eine entscheidende Rolle in der strukturellen Plastizität von Neuronen spielen, wie beispielsweise Synaptophysin, ARC und GAP43 (growth-associated protein 43) (Herring et al. 2009). Insbesondere ARC nimmt über zahlreiche, bisher nicht vollständig verstandene Mechanismen Einfluss auf die Konsolidierung in der späten Phase der LTP, auf die Dichte und Morphologie dendritischer Spines und auf die postsynaptische Rezeptorausstattung (Korb und Finkbeiner 2011). Für eine Reihe neurodegenerativer Erkrankungen mit möglicherweise inflammatorischer Begleitreaktion konnte bereits eine Verbesserung des kognitiven Outcomes durch EE gezeigt werden. Zu nennen sind hier Tiermodelle für Influenza (Jurgens und Johnson 2012), Chorea Huntington, Morbus Parkinson sowie die Auswirkungen eines Schlaganfalls (Nithianantharajah und Hannan 2006). Für die Sepsis-assoziierte Enzephalopathie ist dieser Nachweis bisher noch nicht erbracht worden, daher ist die Untersuchung dieser Therapieoption Ziel der vorliegenden Arbeit.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Tierhaltung

#### 4.1.1 Allgemeines

Zur Durchführung der Versuche wurden 15 Wochen alte, männliche Mäuse des Stammes C57/BL6 mit einem Gewicht von 25-30 g verwendet. Insgesamt wurden 144 adulte Mäuse in den Versuchen eingesetzt. Alle Tierversuche waren durch die Tierschutzkommission und zuständige Behörde (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, AZ 02-085/14) genehmigt. Die Mäuse wurden bis zu Versuchsbeginn und in den ersten zwei Wochen der Sepsis in Standard-Viererkäfigen (245x205x140 mm) auf Standardstreu gehalten. Kommerzielles Futter und Wasser standen ad libidum zur Verfügung. Zwei Wochen nach Sepsis-Induktion wurden die Versuchstiere von einem verblindeten Mitglied der Arbeitsgruppe randomisiert. Die in die Enrichment-Gruppe eingeteilten Tiere wurden in Standard-

Rattenkäfige (590x380x200 mm) mit je sechs Mäusen transferiert (Enrichment-Käfige, siehe unten). Die in die Standard-Gruppe eingeteilten Tiere verblieben in den oben beschriebenen Standard-Viererkäfigen. Als Kontrollgruppe dienten Tiere desselben Stammes, in ihnen wurde keine Sepsis induziert. Die Haltung der Kontrolltiere erfolgte zusammen mit den Tieren der Interventionsgruppe in Standard-Viererkäfigen.

#### 4.1.2 Sepsis-Induktion und -Behandlung

Die Induktion der Sepsis erfolgte nach dem PCI-Modell (Gonnert et al. 2011). Den Tieren wurde dabei gewichtsadaptiert eine Suspension humaner Fäzes-Kulturen intraperitoneal in den rechten oberen Quadranten des Abdomens injiziert. Die verabreichte Menge lag bei 3,5 µl pro Gramm Körpergewicht. Die erste antibiotische Behandlung erfolgte sechs Stunden nach Sepsis-Induktion durch subkutane Injektion von 300 µl Meropenem in 0,9% NaCl. In den folgenden sieben Tagen erfolgte die Antibiotikagabe alle 12 Stunden, dann für weitere drei Tage alle 24 Stunden (Otto et al. 2015). Vor jeder Antibiotikagabe wurde das Befinden der Tiere anhand ihrer Spontanaktivität sowie ihrer Reaktionsfähigkeit auf äußere Stimuli modifiziert nach dem CSS (clinical severity score for evaluation of the clinical status) (Gonnert et al. 2011) auf einer Skala von 1-5 bewertet, wobei 1 ein klinisch unauffälliges, gesundes und 5 ein totes Tier beschreibt (siehe Tabelle 1). Dabei wurden Abstufungen in 0,5-er Schritten gestattet.



**Tabelle 1- Tabelle zur Beurteilung des clinical severity scores**

Grad	Ausprägung	Spontanaktivität	Reaktion auf äußere Reize	Körperhaltung
1	Keine Krankheitszeichen	Aktiv, lebhaft	Neugierig, schnelle Bewegungen	Normal
2	Leichtgradig	Verminderte Aktivität, gelegentliche Unterbrechungen der Aktivität	Verlangsamte aber adäquate Reaktion	Leicht bucklig
3	Mittelgradig	Verlangsamt, schwerfällige Bewegungen	Beschränkt und verspätet	Bucklig
4	Schwergradig	Regungslos, keine Bewegung	Keine Reaktion	Ausgeprägter Buckel
5	Verstorben			

#### 4.1.3 Gruppeneinteilung und Environmental Enrichment

Nach Ende der zweiwöchigen Akutphase der Sepsis wurden die Tiere den Standard- und Enrichment-Käfigen zugeteilt. Die Zuteilung erfolgte nach dem Prinzip der Randomisierung. Neben den Sham-injizierten Tieren wurden nur PCI-Tiere mit einem Fünf-Tages-Score größer elf einbezogen. Zur Berechnung dieses Scores wurde für die ersten fünf Tage der Sepsis jeweils der Mittelwert der beiden CSS berechnet und dann addiert. Tiere, die den Score nicht erreicht haben, wurden zusammen mit den Tieren der Standard- und Sham-Gruppe in den Käfigen belassen und in die weiteren Testungen nicht mit einbezogen.



**Abbildung 1- Beispiel eines Enrichment-Käfigs**

Als Enrichment-Käfige dienten Standard-Rattenkäfige, in denen die Mäuse zu sechst gehalten wurden (siehe Abbildung 1). Tiere der Standard-Käfige wurden in Gruppen von zwei bis vier Mäusen gehalten. Somit war durch die größere Gruppenstärke eine Stimulation durch soziale Interaktionen gegeben. Die Ausstattung der Enrichment-

Käfige bestand aus grauen Rohren unterschiedlicher Länge und Form, die ineinandergesteckt werden konnten, um ein Tunnelsystem mit verschiedenen Ausgängen entstehen zu lassen. Um die motorische Aktivität der Tiere anzuregen wurde zudem jeder Enrichment-Käfig mit einem metallenen Laufrad versehen, das die Tiere nach eigenem Ermessen benutzen konnten. Auditorische Stimuli lieferten Rasseln in Ei- und Kugelform, die Geräusche machen, sobald die Tiere sie berühren oder verschieben. Als Rückzugsmöglichkeiten wurden in jeden Käfig Häuschen aus Plastik sowie Nestmaterial aus Papier bereitgestellt. Wöchentlich wurden die Gegenstände im Käfig umgestellt, um die Komplexität der Umgebung für die Tiere zu erhalten und ihren Erkundungsdrang weiterhin zu stimulieren (Jankowsky et al. 2005).

## 4.2 Verhaltenstestung

### 4.2.1 Allgemeines

In vorliegender Arbeit dient die Verhaltenstestung der Erfassung von Unterschieden im Angstverhalten sowie in der räumlichen Lern- und Merkfähigkeit zwischen den Gruppen im Enrichment- und im Standardkäfig sowie dem Vergleich mit Kontrolltieren, die nicht an einer Sepsis erkrankt waren. Mit der Verhaltenstestung wurde acht Wochen nach Sepsis-Induktion und sechs Wochen nach Transfer der Enrichment-Gruppe in die erweiterten Käfige begonnen. Es wurden nur Tiere mit einbezogen, die klinisch keine Auffälligkeiten mehr zeigten und somit ein Ausheilen der Sepsis bzw. kein erneutes Aufflammen der Infektion angenommen werden konnte. Die Testung der Tiere erfolgte an elf aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 24 Stunden Pause sowie am 18. Tag zur Durchführung des Probe-Trials des MWM.

### 4.2.2 Open Field-Test

Der Open Field-Test ist eine etablierte Methode zur Testung der lokomotorischen Aktivität sowie des Angstverhaltens der Mäuse. Die Tiere werden dazu in eine leere, gleichmäßig ausgeleuchtete Box gesetzt und ihr Verhalten beobachtet. Der Test bildet den natürlichen Konflikt der Nager ab, einerseits eine neue Umgebung erkunden zu wollen und andererseits aber hell ausgeleuchtete, freie Flächen zu meiden (DeFries et al. 1966). Als Kriterien zur Beurteilung der lokomotorischen Aktivität wurde die absolut zurückgelegte Strecke und zur Beurteilung des Angstverhaltens die jeweils im Zentrum und in der Peripherie verbrachte Zeit analysiert (zur Unterteilung der Testfläche siehe

Abbildung 2). Die Tiere wurden dazu Richtung Wand blickend in eine 60x60 cm große, gleichmäßig mit 100 Lux ausgeleuchtete Box mit grauem Boden und weißen Wänden gesetzt und ihre Bewegungen sowie ihr Verhalten über fünf Minuten mit einer an der Decke angebrachten Kamera aufgezeichnet. Nach jedem Tier wurde die Box zur Geruchsneutralisierung mit Desinfektionsmittel gereinigt.

#### 4.2.3 Elevated-Plus-Maze

Bei dem Elevated Plus-Maze (EPM) handelt es sich um ein Tool, das zur Beurteilung des Angstverhaltens von Nagern verwendet wird. Die Tiere werden dabei auf eine erhöhte, Plus-förmige Apparatur mit je zwei offenen, hell ausgeleuchteten und zwei geschlossenen, dunklen Armen gesetzt und geraten dabei in einen Konflikt zwischen ihrem Erkundungsdrang und der ihnen angeborenen Vermeidung erhöhter, hell ausgeleuchteter, offener Flächen. Als Kriterien zur Beurteilung des Angstverhaltens der Tiere werden die jeweils auf den offenen und geschlossenen Armen verbrachte Zeit sowie die insgesamt zurückgelegte Strecke auf der Versuchsapparatur herangezogen. Die Tiere wurden dafür in der Mitte des Raumes in das Zentrum eines einen Meter über dem Boden befestigten Plus mit 68 cm Kantenlänge gesetzt, das aus je zwei sich gegenüberliegenden offenen und geschlossenen Armen besteht. Die Beleuchtung wurde durch zwei unterhalb der offenen Arme befestigten Lampen gewährleistet, die so eingestellt wurden, dass in den geschlossenen Armen 40 Lux, im Zentrum 100 Lux und in den offenen Armen 150 Lux Beleuchtungsstärke herrschten. Anhand einer über der Vorrichtung angebrachten Kamera wurde das Verhalten der Tiere in den ersten fünf Minuten aufgezeichnet. Zwischen den Tieren wurde die Apparatur zur Geruchsneutralisierung mit Desinfektionsmittel ausgewischt. Tiere, die von der Versuchsapparatur heruntergefallen sind, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

#### 4.2.4 Morris Watermaze

Der MWM ist ein Test zur Überprüfung des räumlichen Lern- und Merkvermögens von Nagetieren sowohl im Kurzzeit- als auch im Langzeitgedächtnis. (Vorhees und Williams 2014). Dabei werden die Tiere an acht aufeinanderfolgenden Tagen trainiert, eine in einem kreisrunden Wasserbecken sich unterhalb der Wasseroberfläche befindliche Plattform zu finden, die ihnen als einziger Ausweg dient. Die Orientierung im Raum erfolgt dabei über sich außerhalb des Beckens befindliche Landmarken wie

Gegenstände oder Bilder. Der Lernerfolg der Tiere wird anhand der Zeit, die zum Auffinden der Plattform benötigt wird, sowie der bis zum Auffinden der Plattform zurückgelegten Strecke beurteilt. Am achten Tag wurde zudem ein Probe-Trial durchgeführt, bei dem die Plattform aus dem Becken entfernt wird. Dies dient der Überprüfung, ob das Auffinden der Plattform tatsächlich über das Merken der Position oder aber über eine geschickte Suchstrategie erfolgt. Kriterien zur Beurteilung des Lernerfolges sind die in der Zone, in der sich die Plattform befand (hier die NW (Nord-West) -Zone) verbrachte Zeit und zurückgelegte Strecke. Am fünfzehnten Tag folgten dann ein weiterer Probe-Trial ohne Plattform sowie drei Cued-Trials, bei denen die Tiere eine für sie sichtbare, mit einem Fähnchen markierte Plattform an einer anderen Stelle im Wasser auffinden müssen. Dies dient dem Nachweis, dass die Tiere grundsätzlich fähig sind, eine im Wasser befindliche Plattform aufzufinden und keine generellen Probleme wie Blindheit oder eine starke Stressreaktion den Lernerfolg behindern.

Die Testapparatur bestand aus einem sich in der Mitte des Raumes befindlichen, 119 cm durchmessenden, mit weißer Folie gleichmäßig ausgekleideten Becken. Die Wassertemperatur betrug 20 °C, die Beleuchtungsstärke betrug 30 Lux. Zur Orientierung wurde das Becken in vier Quadranten aufgeteilt (NW, NO (Nord-Ost), SW (Süd-West), SO (Süd-Ost)). Eine bessere Kontrastierung der Filmaufnahmen wurden durch Trüben des Wassers mit handelsüblicher H-Milch erreicht. Dies diente zudem dazu, dass die Tiere die Plattform nicht sehen konnten. Während des gesamten Tests befand sich die Plattform an derselben Position im Becken und 1,5 cm unterhalb der Wasseroberfläche. Die Testung erfolgte an neun aufeinanderfolgenden Tagen mit je drei Durchgängen. Am ersten Tag schwammen die Mäuse zur Habituation 60 Sekunden lang ohne Plattform im Wasser. An den acht folgenden Tagen wurden je drei Durchgänge absolviert, die Tiere wurden dabei nach einem festgelegten Protokoll aus verschiedenen Himmelsrichtungen in das Becken gesetzt (siehe Tabelle 2). Der Durchgang wurde beendet, sobald die Maus die Plattform erreicht und für drei Sekunden auf ihr verweilt hatte. Wurde die Plattform nicht innerhalb einer Minute aufgefunden, wurde die Maus per Handzeichen zu ihr gelotst und dort für 15 Sekunden belassen, damit das Tier sich die Position merken konnte. Zwischen den Durchgängen wurden die Tiere zum Trocknen und zur Erholung für fünf Minuten unter eine Infrarotlampe gesetzt. Zur Orientierung im Raum dienten an den Wänden um das

Becken herum gut sichtbar angebrachte Bilder mit geometrischen Formen (Landmarken).

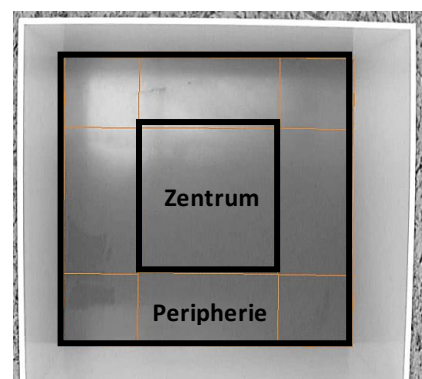
**Tabelle 2- Protokoll zum Einsetzen der Tiere beim MWM**

Tag	Trail 1	Trail 2	Trail 3
1	Habituation für 60 Sekunden, Start aus SW		
2	W	O	S
3	O	S	N
4	S	W	O
5	N	O	S
6	W	O	S
7	O	S	N
8	S	O	W
9	Probe-Trial, Start von SO		
9	S	W	O
16	Probe-Trial, Start von SO		
16	Cued-Trial		

#### 4.2.5 Auswertung der Verhaltenstestung

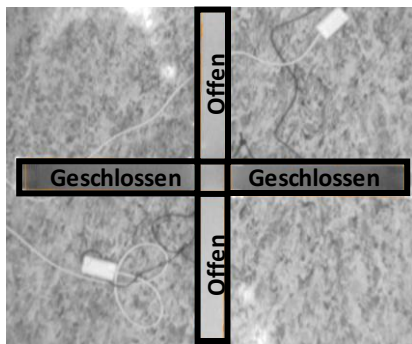
Die Auswertung der Verhaltenstest führte ich mit der Anymaze-Software (Stoelting, Wood Dale, USA) durch.

Zur Auswertung des Open Field-Tests wurde die Fläche in eine zentrale und eine periphere Zone unterteilt (siehe Abbildung 2). Ausgewertet wurde die jeweils in der peripheren und zentralen Zone verbrachte Zeit sowie die insgesamt zurückgelegte Strecke. Der Vergleich erfolgte zwischen den Gruppen PCI+Enrichment (n=17), PCI+Standard (n=15) und Sham (n=15).

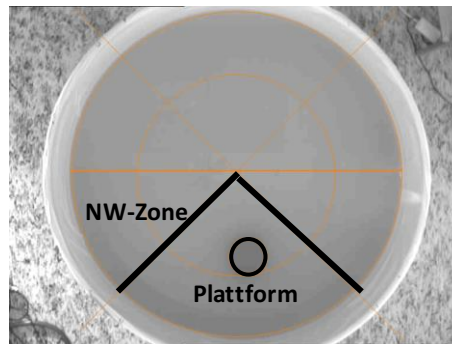


**Abbildung 2- Unterteilung der Testfläche des Open Field-Tests**

Bei der Auswertung des EPM erfolgte die Unterteilung in zwei offene und zwei geschlossene Arme sowie eine zentrale Zone (siehe Abbildung 3). Ausgewertet wurde die insgesamt zurückgelegte Strecke, die Zeit, die jeweils in den offenen und den geschlossenen Armen verbracht wurde, die Gesamtmobilität der Tiere während der Versuchsdauer, ausgedrückt als Anzahl der line crossings und der Anteil der Eintritte in den offenen Arm an der Gesamtzahl der line crossings. Der Vergleich erfolgte zwischen den Gruppen PCI+Enrichment (n=18), PCI+Standard (n=15) sowie Sham (n=15). Zur Auswertung des MWM wurde das runde Becken in vier



**Abbildung 3- Unterteilung der Testapparatur des EPM**



**Abbildung 4- Unterteilung des Wasserbeckens beim MWM**

Quadranten aufgeteilt und diese nach den Himmelsrichtungen mit NO, NW, SO und SW bezeichnet. Die Plattform befand sich im NW-Quadranten (siehe Abbildung 4). Herangezogen wurde dann die Zeit, die die Tiere in den acht Tagen des Tests zum Auffinden der Plattform benötigten. Zur Beurteilung der Langzeitgedächtnisleistung in den Probe trails wurde die Zeit, die in der NW-Zone verbracht wurde sowie die Strecke, die in dieser Zone zurückgelegt wurde, herangezogen. Die getesteten Tiere setzten sich zusammen aus den Gruppen PCI+Enrichment (n=18), PCI+Standard(n=20) und Sham (n=15).

### 4.3 Immunhistochemische Färbungen

#### 4.3.1 Verwendete Lösungen

Im Folgenden sind die Zusammensetzungen und Zubereitungen aller im Weiteren im Methodenteil verwendeten Lösungen alphabetisch aufgelistet. Im Text wird die jeweilige Lösung dann nur noch mit ihrem Namen bzw. der Abkürzung verwendet (Tabelle 3).

**Tabelle 3- Im Methodenteil verwendete Lösungen mit Abkürzungen und Zusammensetzungen**

Name	Abkürzung	Zusammensetzung
Antifreeze-Lösung		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 300 ml Ethylenglycol (M 62,07 g/mol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 500 ml Phosphatpuffer für Antifreeze-Lösung (pH 7,4) mischen</li> <li>- 200 mg Natriumacid (M 65,01 g/mol, Carl Roth) zugeben</li> <li>- 150 g Glukose (M 198,17 g/mol, Carl Roth) unter Rühren zugeben</li> <li>- Mit Aqua dest. (destillata) auf 1000 ml auffüllen</li> </ul>
Blotpuffer		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Für den 10x-Blotpuffer 23,23 g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)-Base (Trizma Base, M 121,14 g/mol, Sigma life Science, Steinheim, Deutschland) und 112,6 g Glycin (Glycine for electrophoresis, M75,079 g/mol, Sigma life Science) in 700 ml Aqua dest. lösen und auf 1000 ml auffüllen</li> <li>- Für den 1x-Blotpuffer 100 ml des 10x-Blotpuffers mit 200 ml Methanol und 700 ml Aqua dest vermischen</li> </ul>
Diamino-Phenylindol-Lösung	DAPI-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Für den DAPI-Stock 5 mg 2-(4-Amidinophenyl) -6-indolecarbamidine dihydrochloride (M 350,25 g/mol, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) mit 5 ml Aqua dest. mischen, bei -20°C lagern.</li> <li>- Für die DAPI-Lösung den DAPI-Stock im Verhältnis 1:500 mit PBS mischen.</li> </ul>
Gelatine 0,5%		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 200 ml Aqua dest, 1 g Gelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 0,1 g Chrom-III-Kaliumsulfat (M 499,41 g/mol, Carl Roth) mischen und 10 Minuten ruhen lassen.</li> <li>- Langsam rühren und auf 40°C erhitzen.</li> <li>- Durch ein Sieb in eine Plastikflasche filtrieren und bei 4°C lagern.</li> </ul>
Mowiol		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 g Mowiol 4-88 (Sigma Aldrich) mit 1200 ml PBS für 16 Stunden bei 4°C rühren.</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml Glycerin zugeben und weitere 16 Stunden bei 4°C rühren.</li> <li>- Die Lösung in 50 ml-Falcons pipettieren und 15 Minuten bei 4000 rpm (Rotationen pro Minute) zentrifugieren, den Überstand auf pH 8,5 einstellen.</li> <li>- 3 ml Natriumazid zugeben und in 50 ml-Falcons abfüllen.</li> <li>- Je 10 ml Mowiol-Zubereitung eine Spatelspitze n-Propyl-Gallate zugeben und gut vortexen.</li> <li>- 20 Minuten bei 4000 rpm zentrifugieren.</li> <li>- Lagerung bei -20°C.</li> </ul>
Paraformaldehyd (4%)	PFA (4%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 40 g PFA (Carl Roth) in 800 ml PBS lösen.</li> <li>- Unter Zugabe von 5 ml NaOH auf pH 7,4 einstellen.</li> <li>- Mit PBS auf 1 l auffüllen.</li> </ul>
Phosphate-buffered saline	PBS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Für Stock 1 42,588 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (M 141,96 g/mol, Merck) und 238,435 g NaCl (M 58,44g/mol, Carl Roth) in 1500ml Aqua dest. lösen und anschließend mit Aqua dest. auf 3000 ml auffüllen.</li> <li>- Für Stock 2 41,397 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (M 137,99 g/mol, Merck) und 238,434 g NaCl in 1500 ml Aqua dest. lösen und anschließend mit Aqua dest. auf 3000 ml auffüllen.</li> <li>- Für das PBS 3500 ml Aqua dest. vorlegen, 87,5 ml Stock 2 zugeben und mit Stock 1 auf pH 7,4 titrieren.</li> <li>- Mit Aqua dest. auf 5000ml auffüllen.</li> </ul>
Phosphatpuffer für Antifreeze-Lösung		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Für Stock 1 7,098 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (M 141,96 g/mol, Merck) in 400 ml Aqua dest. lösen und mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen.</li> <li>- Für Stock 2 13,799 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (M 137,99 g/mol, Merck) in 800 ml Aqua dest. lösen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.</li> <li>- Für den Phosphatpuffer 700 ml Aqua dest. vorlegen, 17,5 ml von Stock 2 dazugeben und mit Stock 1 auf pH 7,4 einstellen.</li> </ul>



		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.</li> </ul>
Natriumdodecylsulfat-polyacrylamid-Gel-Puffer	SDS-PAGE	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Für den 10x SDS-Laufpuffer 30,24 g Tris-Base, 142,50 g Glycin und 10 g 1% SDS in 800 ml Aqua dest. lösen und auf 1000 ml auffüllen</li> <li>- Für den 1x-SDS-Laufpuffer 100 ml davon mit 900 ml Aqua dest. mischen.</li> </ul>
10%-Natriumdodecylsulfat	10%-SDS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100g SDS in 1 l Aqua dest. lösen</li> </ul>
Strippingpuffer		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 ml 0,5 M Tris HCL (62,5M Tris HCL pH 6,7), 140 ml Aqua dest., 3,2 g SDS und 1,11 ml Mecaptoethanol (100mM 2-Mecaptoethanol) mischen.</li> </ul>
Tris(hydroxymethyl-aminomethan) (0,5M)	0,5M Tris	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6,0 g Tris-Base und 100 ml Aqua dest. mit 1M HCL auf pH 6,8 einstellen</li> </ul>
Tris (1,0M)	1,0M Tris, pH 6,8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6,057 g Tris-Base in 35 ml Aqua dest. lösen.</li> <li>- Den pH-Wert auf 6,8 einstellen.</li> <li>- Auf 50 ml auffüllen.</li> </ul>
Tris (1,5M)	1,5M Tris, pH 8,8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 9,086g Tris-Base in 35 ml Aqua dest. lösen.</li> <li>- Den pH-Wert auf 8,8 einstellen.</li> <li>- Auf 50 ml auffüllen.</li> </ul>
Tris-buffered saline	TBS	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 264,4 g Tris-Hydrochlorid Puffer (M 157,60 g/mol, Carl Roth), 38,8 g Tris Puffer Ultra Qualität (M 121,14 g/mol, Carl Roth) und 180 g NaCl in 1000 ml Aqua dest. lösen.</li> <li>- Mit Salzsäure (HCl, 2M) auf pH 7,4 titrieren.</li> <li>- Mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen.</li> <li>- Ein Teil der Lösung mit neun Teilen Aqua dest. mischen.</li> </ul>

#### 4.3.2 Gewebeentnahme

Nach Abschluss der Verhaltenstests wurde ein Teil des Gewebes für die immunhistochemischen Färbungen entnommen. Dafür wurden die Tiere per inhalationem mit Isofluran tief narkotisiert, nach Erlöschen aller Schutzreflexe thorakotomiert, zunächst zwei Minuten transkardial mit PBS und dann acht Minuten mit 4 %-PFA perfundiert. Anschließend wurden die Hirne entnommen und für 24 Stunden in 4 %-PFA nachfixiert, dann 24 Stunden in 10% Saccharose in PBS und

weitere 24 Stunden in 30% Saccharose in PBS inkubiert. Zum Einfrieren wurden die Hirne schließlich für eine Minute in -30°C kaltes Methylbutan gegeben, einzeln verpackt und bei -80°C gelagert.

#### 4.3.3 Immunhistochemische Färbungen

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen ist es möglich, das Vorhandensein von Antigenen durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern nachzuweisen. Das Prinzip der hier verwendeten indirekten immunhistochemischen Färbung basiert darauf, einen für das Antigen spezifischen primären Antikörper auf das Gewebe aufzubringen und in einem zweiten Schritt mit einem sekundären, enzymgekoppelten Antikörper zu markieren. Bei der Entstehung des Enzym-Substrat-Komplexes durch die Bindung von sekundärem an primären Antikörper kommt es zu einer Farbreaktion, die unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar ist.

In Vorbereitung auf die Färbung wurden die bei -80°C gelagerten Gehirne mit Hilfe eines Microtoms (Thermo Scientific Microm HM 450, Thermo Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland) in koronarer Schnittführung auf Höhe des Hippocampus bei -30°C 40 µm dick geschnitten und bis zur weiteren Verarbeitung in Antifreeze-Lösung bei -20°C aufbewahrt.

Zum Anfertigen der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte am ersten Tag zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur angetaut, im weiteren Vorgehen wurde jeder sechste Schnitt eines Hirnes verwendet. Das Gewebe wurde zunächst 6 x 10 Minuten in 12er-Wellplatten mit TBS gewaschen. Für die IBA-Färbung wurden die Schnitte dann 30 Minuten in 6er-Wellplatten in TBS-Plus inkubiert (TBS, 0,1% Triton, 3% Serum, 2% Milchpulver), für die GFAP (glial fibrillary acidic protein) -Färbung erfolgte die Inkubation in TBS-Plus mit in der Verdünnung 1:200 zugesetztem FAB (fragment antigen-binding) -Fragment (AffiniPure Fab-Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (Immunglobulin G), Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA) über 2 Stunden. Über Nacht wurden das Gewebe dann in 12er-Wellplatten bei 4°C in primärem Antikörper in TBS-Plus (IBA (ionized calcium-binding adaptor molecule 1): Anti-IBA 1, Rabbit, Wako Chemicals, Neuss, Deutschland, Verdünnung 1:500 bzw. GFAP: Anti Glial Fibrillary Acidic Protein crone GA5 (mouse monoclonal) MAB360, Jackson Immuno Research Verdünnung 1:500) inkubiert. Am folgenden Tag wurde 3 x 10 Minuten in TBS gewaschen und anschließend 30 Minuten in TBS-Plus in der 6er-

Wellplatte inkubiert. Die Behandlung mit dem in TBS-Plus gelösten sekundären Antikörper (Rhodamin Red-X-conjugated AffiniPure Fab-Fragment Donkey Anti-Rabbit, Jackson Immuno Research, Verdünnung 1:500, für den IBA-Antikörper bzw. Rhodamin Red-X-conjugated AffiniPure Fab-Fragment Donkey Anti-Mouse, Jackson Immuno Research, Verdünnung 1:500, für den GFAP-Antikörper) erfolgte für zwei Stunden in der 12er-Wellplatte. Ab hier wurden die folgenden Schritte unter Abschirmung von Tageslicht durchgeführt. Danach wurde erneut 3 x 10 Minuten in der 12er-Wellplatte in TBS gewaschen. Zuletzt wurden die Schnitte in 0,5% Gelatine auf Objektträger aufgezogen und zum Trocknen gestellt. Zum Anfärben der Zellkerne mit DAPI wurden die Objektträger fünf Minuten in DAPI-Lösung gegeben, 3 x 5 Minuten in PBS gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und schließlich mit Deckgläsern in Mowiol eingebettet.

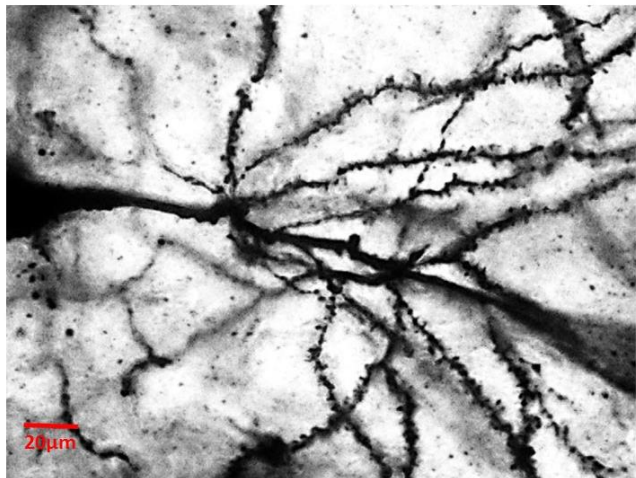
#### 4.3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen nahm ich mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axioplan 2 Imaging, Zeiss, Jena, Deutschland) mit Fluoreszenzlampe (ebq 100, Leistungselektronik Jena) in 20-facher Vergrößerung vor. Zur Bildaufnahme wurde die Axiocam MRc5 (Zeiss) sowie die AxioVision-Software (Zeiss) verwendet. Es wurde eine mehrdimensionale Bildaufnahme angefertigt, die Belichtungszeit des Rhodamin-Kanals betrug dabei 150ms für den GFAP-Antikörper und 300ms für den Iba-1-Antikörper, die Belichtungszeit des DAPI-Kanals lag bei 5ms. Je Versuchstier wurden zwei Hirnschnitte im mittleren Teil des Hippocampus gewählt und Aufnahmen des Gyrus dentatus, der CA 1- und der CA 3-Region angefertigt. Im Weiteren wertete ich nur die Aufnahmen des Rhodamin-Kanals aus, die Aufnahme des DAPI-Kanals diente der Orientierung im Bild. Mit Hilfe der ImageJ-Software wurde die Dichte der Astrozyten sowie der Mikroglia in drei ausgewählten Regionen des Hippocampus berechnet. Verglichen wurde die Gruppe der Tiere in der Akutphase der Sepsis (drei Tage nach Sepsis-Induktion, PCI-früh, n=11) mit der Gruppe der Tiere in der Spätphase der Sepsis (6-8 Wochen nach Sepsis-Induktion, PCI-spät, n=11) sowie mit Sham-Tieren (n=10). Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte verblindet.

## 4.4 Golgi-Färbung

### 4.4.1 Anfertigen der Golgi-Färbung

Die hier verwendete Golgi-Cox-Methode ist eine metallische Färbung, die es dem Betrachter erlaubt, die Morphologie von Neuronen zu beurteilen (Das et al. 2013). Aufgrund der hohen Kontrastierung der schwarzen Quecksilberniederschläge ist es möglich, selbst kleine morphologische Details der neuronalen Fortsätze zu beurteilen (siehe Abbildung 5). Das Prinzip der Golgi-Cox-Methode beruht auf einer



**Abbildung 5 – Mittels Golgi-Färbung dargestellte Verästelung eines hippocampalen Neurons der CA1-Region, Maßbalken 20  $\mu$ m, Vergrößerung 40fach**

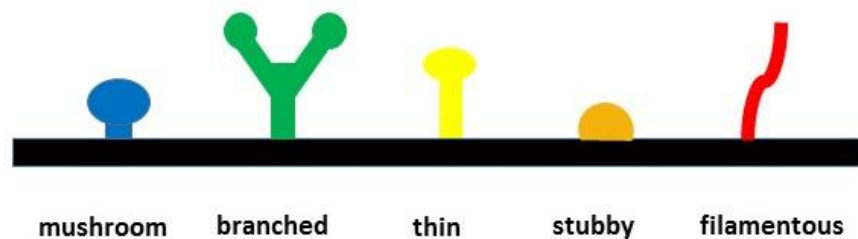
Inkubation der Schnitte in Kaliumdichromat und Quecksilberchlorid, wodurch sich komplexe Quecksilberoxide in den Neuronen ablagern, die dann sichtbar sind. Nach dem Zufallsprinzip färben sich nur einzelne Neurone des Gewebes schwarz an. Da die restlichen Neurone nicht angefärbt und folglich nicht sichtbar sind, ist das gefärbte Neuron von seiner Umgebung gut abgrenzbar und somit eine Beurteilung bis hin zur Morphologie der kleinsten neuronalen Fortsätze, der dendritischen Spines, möglich.

Zur Anfärbung des Gewebes nach der Golgi-Cox-Methode verwendete ich das FD Rapid GolgiStain Kit (FD Neurotechnologies, Columbia MD, USA). Am Vortag der Gewebeentnahme wurde für jedes Hirn ein 15ml-Falcon mit einem 1:1-Gemisch von Lösung A+B vorbereitet und zum Schutz vor Lichteinfall mit Alufolie umwickelt. Am Tag der Gewebeentnahme wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert, dekapitiert, das Gehirn entnommen, mit 0,9% NaCl-Lösung gespült und für 24 Stunden in den vorbereiteten Lösungen inkubiert. Ein Gemisch aus Lösung A+B wurde wie am Vortag der Gewebeentnahme vorbereitet. Nach 24 Stunden wurden die Hirne in diese umgesetzt und für weitere zwei Wochen in Dunkelheit inkubiert. Danach wurde das Gewebe in Lösung C inkubiert, nach 24 Stunden wurde diese erneuert. Nach weiteren vier bis sieben Tagen Inkubationszeit wurden die Hirne für eine Minute in -30°C kaltem Methylbutan eingefroren und bis zum Schneiden bei -80°C gelagert. Die 150  $\mu$ m dicken Schnitte wurden in koronarer Schnittführung auf Höhe des Hippocampus mit

Hilfe eines Kryostats angefertigt, mit Lösung C auf Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte getrocknet. Zur Färbung wurden die Objektträger 2x2 Minuten in Aqua dest. gewaschen und dann für 10 Minuten in einem 1:1:2-Gemisch aus Lösung D, Lösung E und Aqua dest. inkubiert, für weitere 2x4 Minuten in Aqua dest. gewaschen und in aufsteigender Alkoholreihe in 50%, 75% und 95% Ethanol (Carl Roth) für jeweils 4 Minuten und in 100% Ethanol für 2x8 Minuten entwässert. Das Clearing mit Xylol (Carl Roth) erfolgte für 2x4 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckelt.

#### 4.4.2 Auswertung der Golgi-Färbung

Die Auswertung der Golgi-gefärbten Schnitte führte ich verblindet am Lichtmikroskop (Axioskop 2 mot



**Abbildung 6- Schematische Darstellung der morphologischen Spinetypen**

plus, Zeiss) in 100-facher Vergrößerung durch. Zum Tracking der Dendriten verwendete ich die Neurolucida Neuron Tracing Software (Williston, VT, USA). Pro Versuchstier wurden drei Pyramidenzellen im Stratum radiatum der CA1-Region des Hippocampus in drei aufeinanderfolgenden Schnitten ausgewertet. Zunächst wurde die CA1-Region des Hippocampus aufgesucht und dort ein einzeln liegendes Neuron ausgesucht, dessen Dendritenbaum ohne Unterbrechungen angefärbt wurde. Vom Abgang des apikalen Dendriten vom Soma des Neurons ausgehend wurde der Dendritenbaum bis zur tertiären Verzweigung verfolgt und ausgemessen, wobei der Abstand zum Soma zwischen 50 und 150µm betrug. Mit 5µm Abstand zur Abzweigung wurde der Dendrit dann je nach Qualität der Färbung auf einer Länge von 20-50µm verfolgt. Der Verlauf des Dendriten und von ihm abgehende Spines wurden dafür mit der Software manuell nachgezeichnet. Dabei wurden die Länge des Dendriten, die Anzahl und Länge sowie die Morphologie der Spines erfasst. Die Unterteilung der Morphologie erfolgte dabei in fünf Gruppen (siehe Abbildung 6): filamentous, thin, stubby, mushroom und branched (Risher et al. 2014). Als Spines vom filamentous-Typ wurden dabei Fortsätze gewertet, deren Länge mehr als 1,5µm betrug, kürzere Fortsätze wurden als thin-Typ gewertet. Fortsätze, deren Breite am Kopf mehr als

0,6µm betrug wurden dem mushroom-Typ zugeordnet, betrug das Verhältnis von Länge zu Breite weniger als 1 wurde der Fortsatz dem stubby-Typ zugeordnet. Um einen branched-Typ handelte es sich, wenn der Fortsatz mehr als zwei Köpfe besaß. Verglichen wurden die Dichte und Länge der Spines sowie die Dichte der morphologischen Typen zwischen den Gruppen PCI+Enrichment (n=9), PCI+Standard (n=9) und Sham (n=11).

## 4.5 Western Blot

### 4.5.1 Fragestellung und Theorie zur Durchführung des Western Blots

Um die Menge an vorhandenem ARC-Protein zwischen den Versuchsgruppen vergleichen zu können führte ich einen Western Blot mit Proteinlysaten aus den Hippocampi der Mäuse durch. Beim Western Blot werden die Proteine eines Gewebslysates zunächst anhand einer SDS (Natriumdodecylsulfat)-Polyacrylamidgelelektrophorese nach der Länge ihrer Aminosäureketten aufgetrennt (Laemmli 1970). SDS ist stark negativ geladen und lagert sich deshalb an die basischen Aminosäuren der Proteine an. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Protein-SDS-Komplexe im elektrischen Feld zur Kathode bewegen hängt nun nur noch von der Größe der im Gel linearisierten Proteine sowie der Dichte der Trägermatrix ab. Kleine Proteine wandern dabei schneller, da sie von der Trägermatrix weniger stark ausgebremst werden. Um anschließend die gesuchten Proteine per Immundetektion nachweisen zu können werden die im Elektrophorese-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet (Towbin et al. 1979). Hierfür wird senkrecht zum Gel eine Spannung angelegt, die Proteine wandern vollständig zur Membran, werden dort statisch gebunden und können nicht weiter diffundieren. Durch das Aufbringen von Antikörpern auf die Nitrocellulosemembran können die Proteine dann nachgewiesen und ihre Menge quantifiziert werden.

### 4.5.2 Probenisolation

Um die Proteine aus den Gewebeproben zu isolieren wurden die bei -80°C gelagerten Röhrchen mit den Gewebeproben des Hippocampus auf Eis gestellt. Jedem Röhrchen wurden 150µl Lysepuffer (hergestellt aus 10ml Stocklösung für Lysepuffer Proteine und einer Tablette „Complete mini“ (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)) zugegeben und mit Hilfe eines Mixers homogenisiert. Die Probe wurde danach in ein

frisches Röhrchen pipettiert. Nun wurde die Probe mit fünf Ultraschallpulsen sonifiziert (Sonopuls, Bandelin electronics, Berlin, Deutschland) und anschließend 15 Minuten auf Eis kaltgestellt. Danach wurde in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 15 Minuten lang bei 10000 g rcf (relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert, der Überstand in ein neues Röhrchen pipettiert und auf Eis gestellt.

#### 4.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau bildet mit den Seitenketten von Proteinen Komplexe, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470nm zu 595nm verschiebt. Durch Messung des Extinktionskoeffizienten und dem Vergleich mit einer Standardkurve für das jeweilige Protein kann dann die Proteinkonzentration ermittelt werden. Dazu wurden Einmalküvetten aus Polystyrol (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit je 489 µl Aqua dest., 2µl der Probe und 500µl Bradford-Reagenz (Quick Start Bradford 1x Dye Reagent, BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) versetzt, zudem wurde als Negativkontrolle eine Küvette mit 500µl Aqua dest und 500µl Bradford-Reagenz versetzt. Um ein stabiles Produkt zu erhalten, ruhten die Proben daraufhin 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Abschirmung von Tageslicht. Dann erfolgte die Messung des Extinktionskoeffizienten mit dem Photometer (Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Lag der Messwert der Küvette außerhalb des Messbereiches, so wurde die Probe mit dem übrigen Lysepuffer verdünnt und erneut in einer Küvette mit Aqua dest. und Bradford-Reagenz gemessen, solange bis der Wert im Messbereich des Photometers lag. Anhand der Proteinkonzentration wurde dann die Menge Probe errechnet, die 10µg Protein enthält, und so die Menge der Probe errechnet, die in die Taschen des Gels pipettiert werden muss.

#### 4.5.4 Vorbereitung der Proben für den Western Blot

Zur Vorbereitung der Proben für den Western Blot wurde die Probe in ein neues Röhrchen pipettiert, in einem weiteren Röhrchen im Verhältnis 4:1 mit 5xSDS-Laufpuffer verdünnt und anschließend auf einem Wärmeblock (Block Heater, Stuart Scientific, Staffordshire, UK) bei 100°C 5 Minuten lang gekocht. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 4.5.5 SDS-Page

Für den SDS-Page wurden zunächst 10%-Acrylamid-Gele hergestellt. Dazu wurden für das Trenngel 7900µl Aqua dest., 6700µl 30% Acrylamid-Mix, 5000µl 1,5 M Tris (pH 8,8), 200µl 10% SDS, 200µl APS (Ammoniumpersulfat) und 8µl TEMED (Tetramethylethyldiamin, M 116,21, Roth) gemischt, in eine Haltevorrichtung pipettiert und polymerisierten dort für 30 Minuten (Menge reicht für 4 Gele). Indessen wurde das Sammelgel aus 3400µl Aqua dest., 830µl 30% Acrylamid-Mix, 630µl 1,0 M Tris (pH 6,8), 50µl 10% SDS, 50µl 10% APS und 5µl TEMED hergestellt und, sobald diese fest geworden sind, auf die Trenngele pipettiert. Mit eingesteckten Kämmen für die Probestaschen polymerisierte das Trenngel dann für weitere 15 Minuten. Die vollständig fest gewordenen Gele wurden dann in eine Elektrophorese-Kammer (PowerPac Basic, BioRad, München) gespannt und vollständig mit 1x-SDS-Laufpuffer bedeckt. In die Probestaschen wurde nacheinander die für jede Probe errechnete Menge pipettiert, in die letzte Tasche jedes Gels wurden 5µl des Standards (BioRad Precision Plus Protein Western C Standard, BioRad) gegeben. Zur Auftrennung der Proteine wurde für die Dauer von 1,5 Stunden eine Spannung von 100V angelegt.

#### 4.5.6 Western Blot

Zur Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde anschließend der Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer entfernt und in der Blotvorrichtung auf eine mit Filterpapier bedeckte Matte gelegt. Auf das Gel wurden eine in Methanol aktivierte Nitrocellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und eine weitere Matte gelegt und die Blotvorrichtung verschlossen. Matten und Filterpapiere wurden vorher in 1x-Blotpuffer getränkt. Das so entstandene Sandwich wurde dann in die mit 1x-Blotpuffer gefüllte Blotkammer (PowerPac Basic, BioRad) gestellt und die Proteine bei einer Spannung von 100V für 60 Minuten auf die Membran transferiert. Danach wurden die Membranen dem Sandwich entnommen und 5 Minuten in TBS-T (tris-buffered saline with Tween20) gewaschen. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern, wurden die Membranen dann für eine Stunde in 5% Milchpulver (Sigma Aldrich) in TBS-T geblockt. Es folgte dreimaliges Waschen für je 5 Minuten in TBS-T. Der ARC-Antikörper (Arc/Arg3.1, MW 55(45), guineapig, SySy, Göttingen Deutschland) wurde in der Verdünnung 1:7500 in 5%-Milchpulver in TBS-T aufgebracht. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte auf einem Rührschüttler bei 4°C über Nacht. Am



folgenden Tag wurden die Membranen drei Mal für fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Für den ARC-Antikörper wurde als sekundärer Antikörper goat-anti-guinea pig IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) in der Verdünnung 1:2000 mit 0,4µl HRP je 10 ml Flüssigkeit in 5% Milchpulver in TBS-T verwendet. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten auf einem Rührschüttler. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T für fünf Minuten wurden die Membranen mit Hilfe eines ECL (enhanced chemoluminescence) -Kits (Clarity ECL Western Blotting Substrate, BioRad) nach Herstellerangaben entwickelt.

Da GAPDH und der ARC-Antikörper getrennt auf die Membranen aufgebracht werden müssen, mussten die ARC-Membranen anschließend gestrippt werden. Dazu wurden die Membranen nach dem Entwickeln drei Mal zehn Minuten in TBS-T gewaschen um das ECL abzuwaschen. Danach wurden die Membranen für 30 Minuten bei 50°C in Strippingpuffer inkubiert, drei Mal zehn Minuten in TBS-T gewaschen, für eine Stunde mit 5% Milchpulver in TBS-T bei Raumtemperatur geblockt und drei Mal für fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation des GAPDH (0,4µl je 10 ml 5% Milchpulver in TBS-T) erfolgte auf einem Rührschüttler bei 4°C über Nacht. Am dritten Tag wurden die Membranen wieder drei Mal zehn Minuten in TBS-T gewaschen, als sekundärer Antikörper wurde goat anti-rabbit IgG-HRP in der Verdünnung 1:2000 mit 0,4µl HRP je 10 ml Flüssigkeit in 5% Milchpulver in TBS-T für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rührschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten in TBS-T wurden die Membranen wie oben beschrieben entwickelt.

#### 4.5.7 Auswertung des Western Blots

Die Auswertung des Western Blots erfolgte mit der ImageJ-Software. Dabei wurden die Antikörperbanden und die Banden des Standards densitometrisch quantifiziert und mit einer sich auf jeder Blotmembran befindlichen Standardprobe normalisiert. Es wurden insgesamt Proben von 23 Mäusen analysiert, wobei je n=7 Tieren auf die Gruppen PCI+Enrichment und PCI+Standard und n=9 Tiere auf die Sham-Gruppe entfielen.

## 4.6 Messung der Langzeitpotenzierung

### 4.6.1 Allgemeines

Die Messung der LTP im Hippocampus von Versuchstieren ist eine in der Elektrophysiologie etablierte Untersuchung, die als neurophysiologisches Korrelat der Gedächtnisbildung gilt und mit der die zugrundeliegende synaptische Plastizität abgebildet werden kann. Oftmals wird hierbei die glutamaterge synaptische Verbindung von CA3-Pyramidenzellen auf CA1-Neurone durch den Schaffer-Kollateral-Signalweg untersucht. Kommt es an einer glutamatergen Synapse zu vermehrter Aktivität, so erhöht sich die synaptische Übertragungseffizienz an den Zielneuronen. Dabei spielen eine Vielzahl von prä- und postsynaptischen Mechanismen eine Rolle. Präsynaptisch geschieht dies unter anderem durch eine gesteigerte Transmitterfreisetzung, postsynaptisch durch Aktivierung von NMDA-Rezeptoren mit hoher Calcium-Leitfähigkeit, was dann zu posttranslationalen Modifikationen und zu einem vermehrten Einbau von schnellen AMPA-Rezeptoren an der Postsynapse führen kann. Bei stabileren LTP-Formen wird auch eine dauerhafte Veränderung der Proteinsynthese und der Genexpression bewirkt. Durch Ableitung des postsynaptischen Feldpotentials an den CA1-Neuronen können diese plastischen Veränderungen durch eine Verstärkung des Signals quantifiziert und verglichen werden (Raymond 2007). Dies geschieht entweder durch eine Analyse der Maximalamplitude der Feldpotentiale oder der Steilheit des Anstiegs des Feldpotentials. Letzteres ist zu bevorzugen, da hierbei stabilere Ergebnisse erreicht werden können und präparationsbedingte Unterschiede zwischen den Messungen minimiert werden.

### 4.6.2 Präparation der Gewebeschnitte

Zur Präparation der Hirne wurde Lösung 1 (40mM NaCl (Natrium-Chlorid, 0,9%ig), 25mM NaHCO<sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat), 10mM Glucose, 150mM Sucrose, 4mM KCl (Kaliumchlorid), 1,25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat), 7,0mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5mM CaCl<sub>2</sub> (Kalziumchlorid)) hergestellt, im Eisbad auf 4°C heruntergekühlt und mit Carbogen für 30 Minuten begast. Dann wurde sie mit 1M HCL (Salzsäure) bzw. mit 1M NaOH (Natriumhydroxid) auf pH 7,35 eingestellt und bis zur weiteren Verwendung gekühlt.

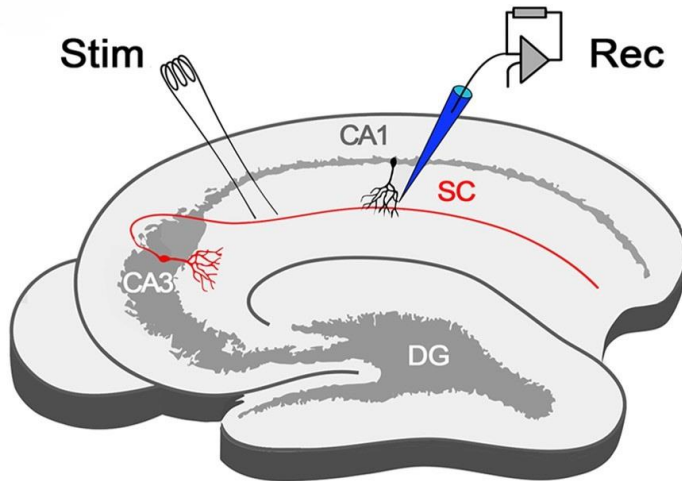
Zur Lagerung der Schnitte sowie zur Verwendung am Messstand wurde eine zweite Lösung hergestellt (124mM NaCl, 26mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM Glucose, 3,4mM KCl, 1,2mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub> und 2mM MgSO<sub>4</sub> (Magnesiumsulfat)). Sie wurde im Wasserbad auf 37°C erhitzt, dabei für 30 Minuten mit Carbogen begast und anschließend mit 1M HCl bzw. 1M NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Temperatur von 37°C erhalten.

Zur Gewebeentnahme wurde die Maus mit Isofluran narkotisiert und nach Erlöschen aller Schutzreflexe die Dekapitation durchgeführt. Die Präparation des Gehirns erfolgte in gekühlter Lösung 1. Für die Messung wurde eine koronare Schnittebene in Höhe des Hippocampus gewählt, das Schneiden erfolgte im Wasserbad der Schneidevorrichtung (Leica VT 1200S, Vibratome Line, Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) in Lösung 1 unter Begasung mit Carbogen. Die Schnittdicke betrug 400µm bei einer Schnittgeschwindigkeit von 0,03mm/s. Anschließend erfolgte das „Kochen“ der Schnitte im Wasserbad bei 37°C für 60 Minuten, danach ruhten die Schnitte für weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur in Lösung 2.

#### 4.6.3 Messung der Potentiale

Zur Durchführung der Messung wurde der Schnitt in die Messkammer des Mikroskops gelegt. Zur Erhaltung der Zellen wurde anhand einer Schlauchpumpe (Ismatec, Wertheim, Deutschland) ein Kreislauf mit Lösung 2 und einer Flussgeschwindigkeit von 3,5ml/min installiert, die Temperatur im Wasserbad des Mikroskops wurde konstant auf 37°C und der pH bei 7,4 gehalten. Zur Stimulation wurde eine speziell angefertigte Platin-Elektrode an den apikalen Dendriten der Neurone der CA3-Region des Hippocampus eingebracht. Für die Ableitung wurden Pipetten aus Borosilikatglas mit einem Durchmesser von 2mm und einem Widerstand von 3-5MΩ präpariert (Flaming/Brown Micropipette Puller Modell P-1000, Sutter Instrument, Kalifornien, USA). Die Ableitung erfolgte an den apikalen Dendriten der Neurone der CA1-Region des Hippocampus (siehe Abbildung 7).

Bei einer Stimulationsdauer von  $500\mu\text{s}$  wurde die Stimulationsstärke bei jeder Messung so gewählt, dass gerade eben ein EPSP (exzitatorisches postsynaptisches Feldpotential) zu sehen war. Die Stimulationsstärke lag so zwischen  $50$  und  $300\mu\text{V}$ . Sobald eine stabile Messung vorlag wurde eine Input-Output-Kurve zur Beurteilung



**Abbildung 7- Schema zur Positionierung der Stimulationselektrode (Stim) in der CA3-Region und der Ableitelektrode (Rec) in der CA1-Region des Hippocampus; mit freundlicher Genehmigung von H.Haselmann**

der synaptischen Stärke erstellt. Dabei wurde mit einer Frequenz von  $0,03\text{Hz}$  stimuliert, es erfolgten jeweils 3 Messungen bei  $50\mu\text{V}$ ,  $100\mu\text{V}$ ,  $200\mu\text{V}$ ,  $300\mu\text{V}$ ,  $400\mu\text{V}$  und  $500\mu\text{V}$ . Danach wurde die Baseline bei oben bestimmter Stimulationsstärke mit einer Frequenz von  $0,03\text{Hz}$  für 15 Minuten gemessen. Anschließend erfolgte die Messung eines Paired-Pulse-Protokolls zur Ermittlung einer Fazilitierung/Depression im Rahmen einer Kurzzeit-Plastizität mit einem Interstimulus-Intervall von  $100\text{ms}$ . Es schloss sich eine weitere Messung der Baseline für 15 Minuten an. Danach erfolgte die Durchführung der Theta-Burst-Stimulation zur Induktion der LTP mit zehn Theta-Bursts von je vier Pulsen von  $100\text{Hz}$  mit einem Interstimulusintervall von  $200\text{ms}$ . Dies wurde zehn Mal mit einer Frequenz von  $0,03\text{Hz}$  wiederholt (Protokoll aus (Raymond 2007)). Es folgte nach der LTP Induktion wieder die Messung der Feldpotentiale bei  $0,03\text{Hz}$  Frequenz über einen Zeitraum von 30 Minuten, dann die erneute Messung des Paired-Pulse Protokolls ( $100\text{ms}$  Interstimulus-Intervall) und anschließend eine weitere Messung der Feldpotentiale bei  $0,03\text{Hz}$  über 30 Minuten.

#### 4.6.4 Auswertung der LTP-Messungen

Die Messungen wurden an fünf Tieren der Gruppe PCI+Enrichment, fünf Tieren der Gruppe PCI+Standard und vier Sham-Tieren durchgeführt. Die Auswertung der Messungen erfolgte anhand des Programms Igor Pro (WaveMetrics, Lake Oswego, Oregon, USA). Ausgewertet wurde die Anstiegssteilheit (Slope) des exzitatorischen Postsynaptischen Potentials (EPSP) vor und nach Potenzierung.

#### 4.7 Statistische Auswertungen

Der Vergleich der Messwerte der unterschiedlichen Gruppen erfolgte durch einen one way- ANOVA (Programm Sigma Plot 12.0, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA). Passierten die Messwerte den vorgeschalteten Normalitätstest nach Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ) oder den Equal-Variance-Test ( $p > 0,05$ ) nach Brown-Forsythe nicht, wurde ein nicht-parametrischer Kruskal-Wallis One Way ANOVA „on Ranks“ durchgeführt. Als posthoc-Test diente bei normalverteilten Daten der Holm-Sidak-Test und bei nicht normalverteilten Daten die All Pairwise Multiple Comparison Procedure (Dunn's Method) als nicht-parametrischer Test. Soweit nicht anders vermerkt sind die Ergebnisse der Gruppen als Median der Einzelwerte angegeben. Unterschiede ab einem p-Wert von  $<0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Darstellung des Signifikanzniveaus in den Diagrammen erfolgt durch Sternchen (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

### 5. Ergebnisse

#### 5.1 Verhaltenstestung

##### 5.1.1 Keine Veränderung der allgemeinen und lokomotorischen Aktivität im Open Field-Test durch EE

In der Open Field-Testung ergab sich für die insgesamt zurückgelegte Strecke in der Box in den Gruppen ein Median von PCI+Enrichment  $x=20,6m$ , PCI+Standard  $x=23,4m$  und Sham  $x=24,3m$ . Die im Zentrum verbrachte Zeit lag in der EE-Gruppe bei PCI+Enrichment  $t=26,1s$ , in der Standard-PCI-Gruppe bei PCI+Standard  $t=25,3s$  und in der Sham-Gruppe bei  $t=26,7s$ . Dagegen lag die in der peripheren Zone verbrachte Zeit bei PCI+Enrichment  $t=273,9s$ , PCI+Standard  $t=274,7s$  und Sham  $t=273,2s$ . Statistische Unterschiede sind in keiner der Kategorien zu eruieren (s. Abbildung 8).

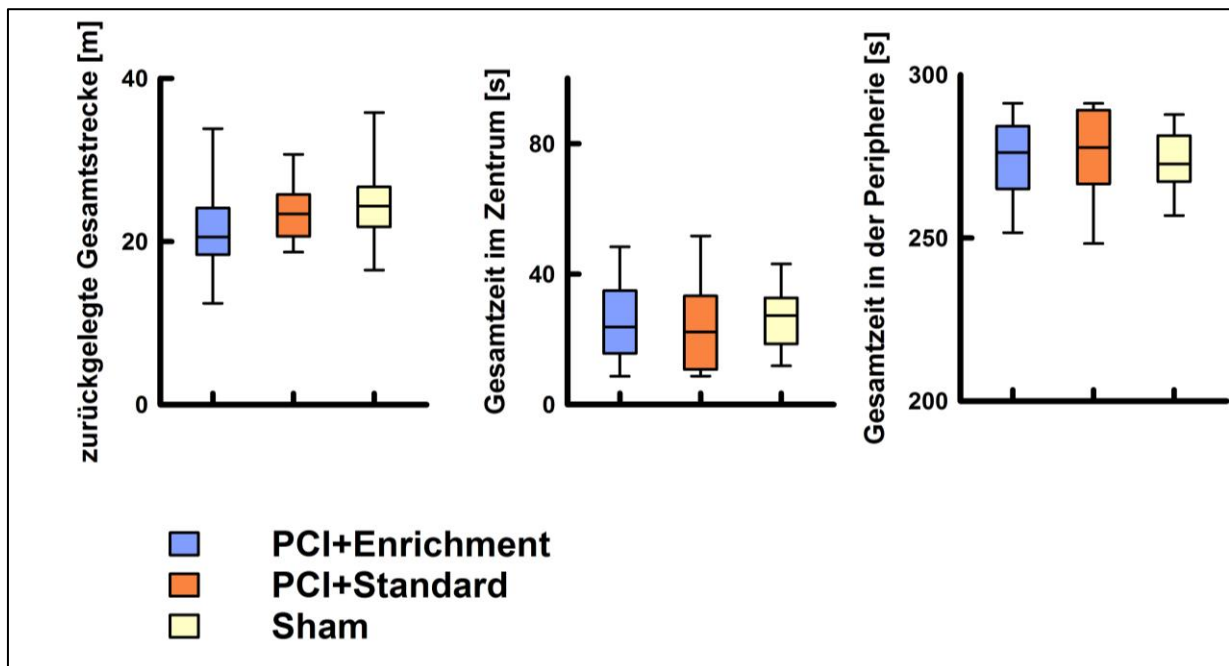


Abbildung 8- Ergebnisse des Open Field-Tests

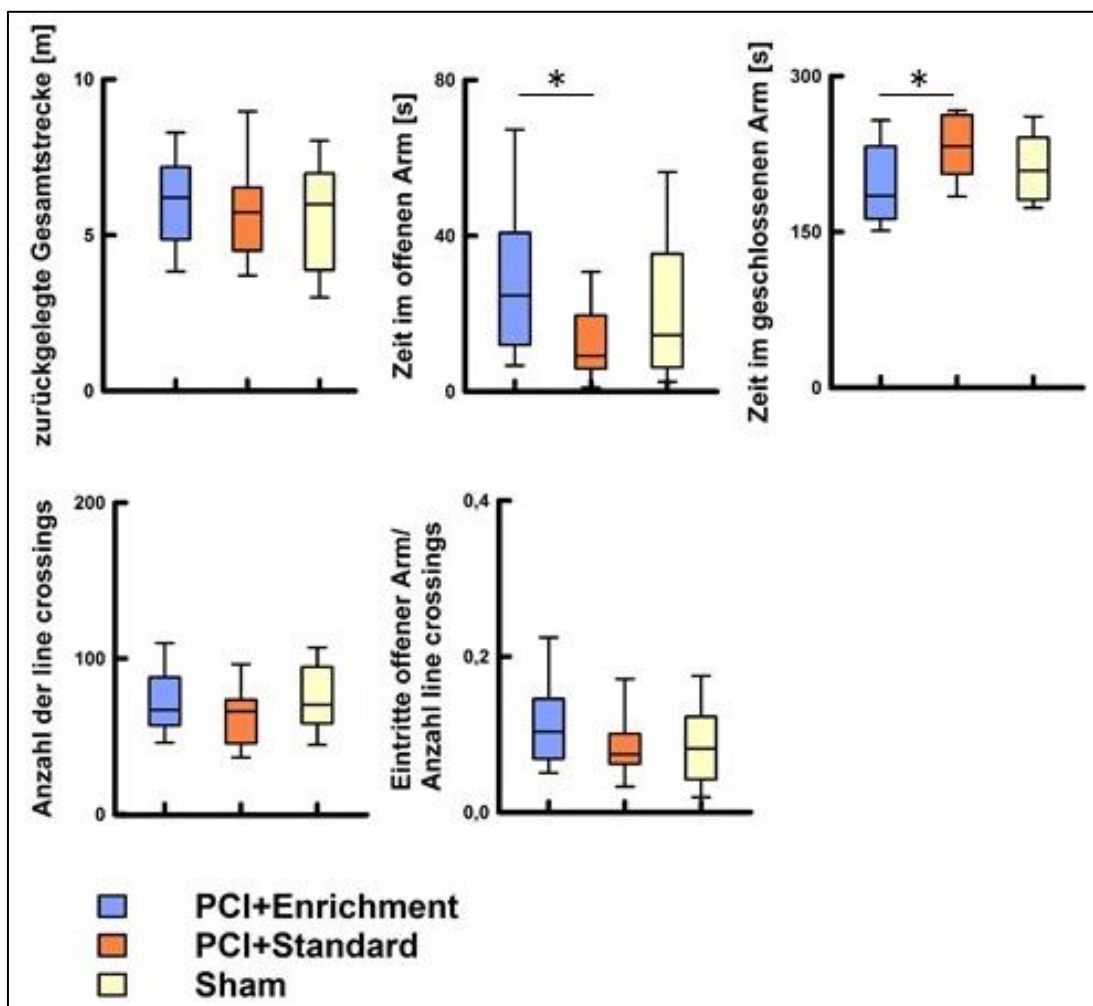


Abbildung 9- Ergebnisse des EPM

### 5.1.2 Vermindertes Angstverhalten durch EE im EPM

Im EPM legten die Gruppen im Median eine Strecke von PCI+Enrichment  $x=6,1\text{m}$ , PCI+Standard  $x=5,8\text{m}$  und Sham  $x=5,6\text{m}$  zurück. In Bestätigung der Daten aus dem Open Field unterscheidet sich die allgemeine Laufaktivität der Tiere zwischen den Versuchsgruppen auch im EPM nicht. Die gesamte Mobilität im Versuchsaufbau, ausgedrückt durch die „number of line crossings“, also der Wechsel zwischen den Zonen der Apparatur, unterschied sich zwischen den Gruppen mit PCI+Enrichment=67, PCI+Standard=66 und Sham=70,5 ebenso nicht. Dagegen ist die Zeit, die die Tiere der PCI+Enrichment-Gruppe im offenen Arm verbrachten, im Vergleich zur PCI+Standard-Gruppe signifikant erhöht, sie betrug PCI+Enrichment  $t=24,7\text{s}$ , PCI+Standard  $t=9,2\text{s}$  und Sham  $t=14,6\text{s}$  (PCI+Enrichment vs. PCI+Standard \*;  $p=0.014$ ). Dagegen lag die im geschlossenen Arm verbrachte Zeit bei PCI+Enrichment bei  $t=184,4\text{s}$ , PCI+Standard  $t=232,5\text{s}$  und Sham  $t=180,9\text{s}$ . Auch hier ist der Unterschied zwischen PCI+Enrichment und PCI+Standard statistisch signifikant, die Tiere in der Standard-Unterbringung verbrachten mehr Zeit im geschlossenen Arm der Versuchsanordnung (\*;  $p=0,026$ ). Ebenso lag der Anteil der Eintritte in die offenen Arme an der „number of line crossings“ in der Gruppe der EE-Tiere etwas höher als in der Gruppe der unter Standardbedingungen untergebrachten Tiere: PCI+Enrichment=0,103, PCI+Standard=0,0742 und Sham=0,0815 ( $p=0,180$ ) (siehe Abbildung 9).

### 5.1.3 Verbesserung des räumlichen Lernens durch EE

Die von den Versuchsgruppen an den unterschiedlichen Tagen benötigte Zeit zum Auffinden der Plattform (Median) und das Signifikanzniveau sind in Tabelle 4 dargestellt.

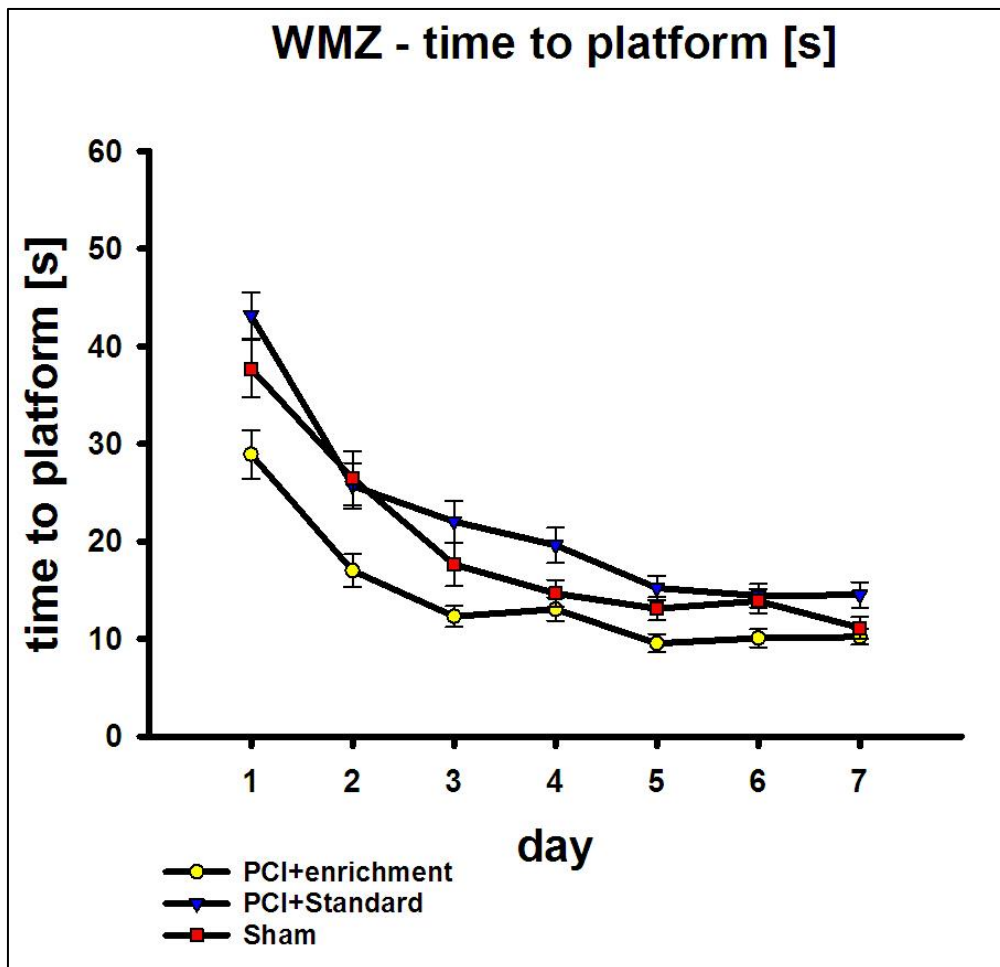
In der Two Way-Anova-Analyse zeigte sich, dass grundsätzlich alle Versuchsgruppen das Auffinden der Plattform gelernt hatten, der Median der für das Auffinden der Plattform benötigten Zeit lag in der Gruppe PCI+Enrichment bei 25,2s an Tag 1 und 8,2s an Tag 7 ( $p<0,001$ ), in der Gruppe PCI+Standard bei 50,0s an Tag 1 und 11,7s an Tag 7 ( $p<0,001$ ) und in der Sham-Gruppe bei 36,1s an Tag 1 und 8,6s an Tag 7. Es zeigte sich zudem, dass die Tiere der Gruppe PCI+Enrichment die Plattform an den ersten drei Versuchstagen signifikant schneller fanden als die Tiere der Gruppe

PCI+Standard, diese Tendenz setzte sich im weiteren Versuchsverlauf, allerdings ohne statistische Signifikanz, fort (siehe Abbildung 10).

**Tabelle 4- Ergebnisse des MWM: Zeit der zum Auffinden der Plattform benötigten Zeit an den Versuchstagen und Signifikanzen (n.s.= nicht signifikant)**

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
PCI+Enrichment	25,200	12,600	9,850	9,600	9,500	7,900	8,200
PCI+Standard	50,0	21,150	16,200	15,400	12,700	11,700	11,700
Sham	36,100	19,800	12,100	11,300	10,100	11,600	8,600
PCI+Enrichment vs. PCI+Standard	***	**	**	p=0,068	n.s	n.s.	n.s.
PCI+Standard vs. Sham	n.s	n.s	n.s	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
PCI+Enrichment vs. Sham	**	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.



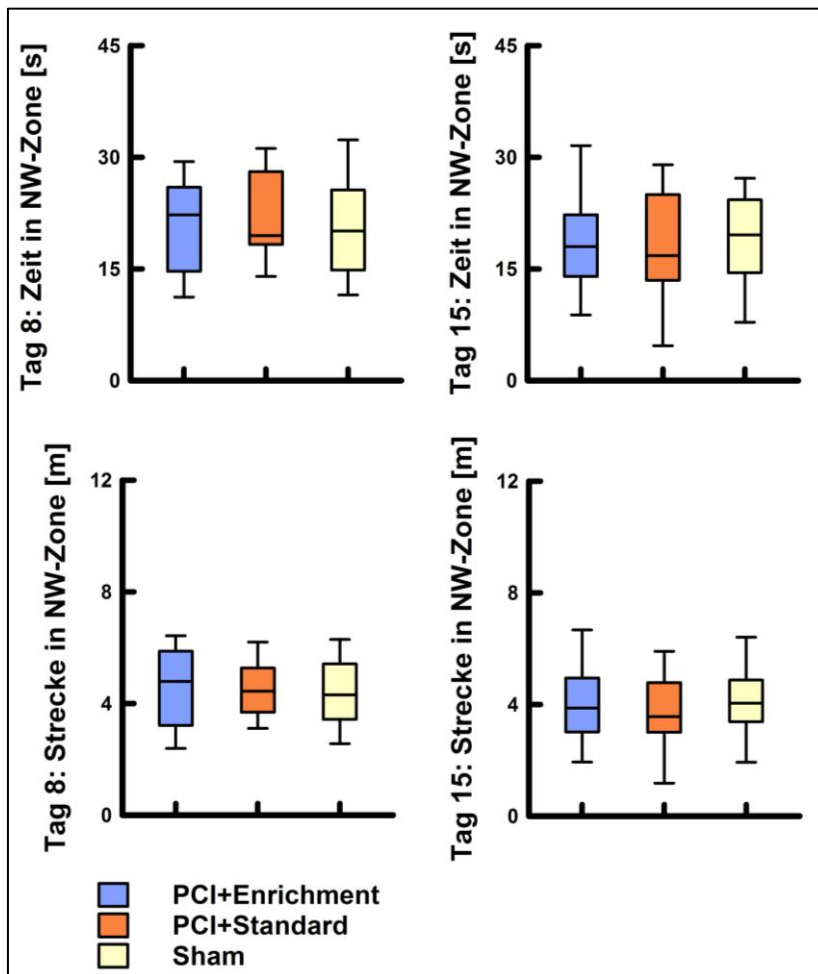


**Abbildung 10- Lernkurve des MWM, Zum Auffinden der Plattform benötigte Zeit in Sekunden an den einzelnen Versuchstagen**

#### 5.1.4 Keine Verbesserung des Erinnerungsvermögens durch EE

Am ersten Testtag zur Testung des Erinnerungsvermögens (sog. Recall, Tag 8) im MWM wurde die Plattform auf dem Wasserbecken entfernt und das Verhalten der Tiere beim Suchen danach analysiert. Dabei wurde die Zeit gemessen, die die Versuchstiere in der NW-Zone verbrachten, da sich in diesem Quadranten zuvor die Plattform befand. Die zurückgelegte Strecke in dieser Zone unterschied sich zwischen den Gruppen nicht, sie lag bei PCI+Enrichment bei  $x=4,5\text{m}$ , PCI+Standard  $x=4,5\text{m}$  und Sham  $x=4,4\text{m}$ . Die in der NW-Zone verbrachte Zeit unterschied sich ebenso nicht, sie lag bei PCI+Enrichment bei  $t=20,7\text{s}$ , PCI+Standard  $t=21,8\text{s}$  und Sham  $t=20,9\text{s}$ . Der Erwartungswert für ein nur zufälliges Aufhalten in der Zone liegt bei 15 Sekunden. Auch am zweiten Testtag (Tag 15) konnten keine Unterschiede gefunden werden, die zurückgelegte Strecke lag bei PCI+Enrichment bei  $x=4,1\text{m}$ , PCI+Standard  $x=3,6\text{m}$  und

Sham  $x=4,1m$  und die Zeit bei PCI+Enrichment  $t=18,8s$ , PCI+Standard  $t=17,5s$  und Sham  $t=18,8s$  (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11- Ergebnisse der Probe Trails an Tag 8 und Tag 15 des MWM**

## 5.2 Immunfluoreszenz

Untersucht wurde die Dichte von Zellen des hirsnspezifischen Immunsystems in koronaren Hippocampusschnitten in der Akutphase der Sepsis (drei Tage nach Induktion) sowie nach Ausheilen der Erkrankung (6-8 Wochen nach Induktion). Als Vergleichsgruppe dienten gesunde, sham-injizierte Tiere

### 5.2.1 Zunahme der Mikroglia-Dichte in der Akutphase der Sepsis

Für die Tiere in der Akutphase der Erkrankung (PCI früh) ergab sich eine Mikroglia-Dichte mit einem Median von  $3,655/\mu m^2$ , für die Tiere nach durchlebter Sepsis (PCI spät)  $3,403/\mu m^2$  und für die Tiere der Sham-Gruppe von  $2,837/\mu m^2$  (siehe Abbildung

12 und Abbildung 13). Statistisch signifikant zeigte sich hierbei der Unterschied zwischen PCI früh und Sham (\*,  $p=0,019$ ).

### 5.2.2 Keine Unterschiede in der Dichte der Astrozyten

Für die Dichte der Astrozyten in der Akutphase der Sepsis bzw. nach durchlebter Sepsis konnte nur eine Tendenz erhöhter GFAP-Dichte nach Sepsis, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden. Der Median betrug in der Gruppe PCI früh  $2,700/\mu\text{m}^2$ , für die Gruppe PCI spät  $3,046/\mu\text{m}^2$  und für die Sham-Gruppe  $2,671/\mu\text{m}^2$  (siehe Abbildung 12 und Abbildung 14).

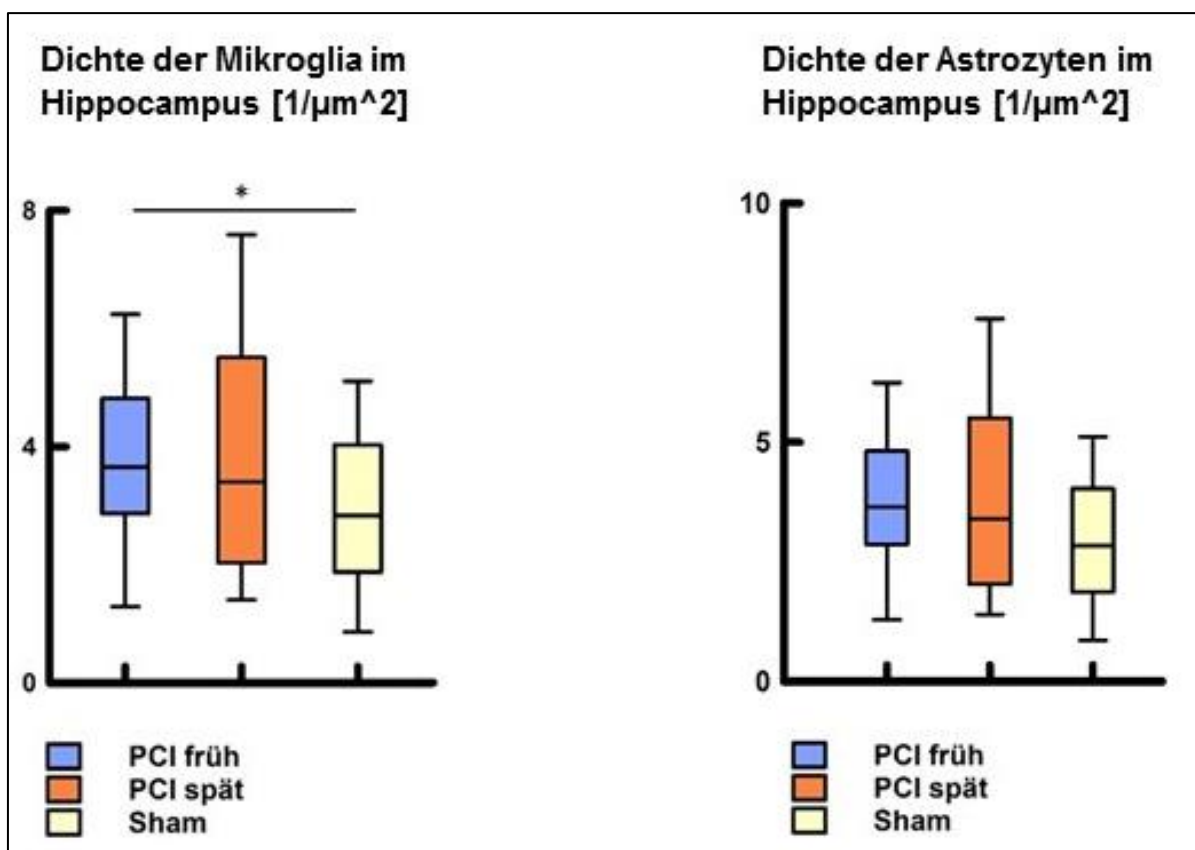
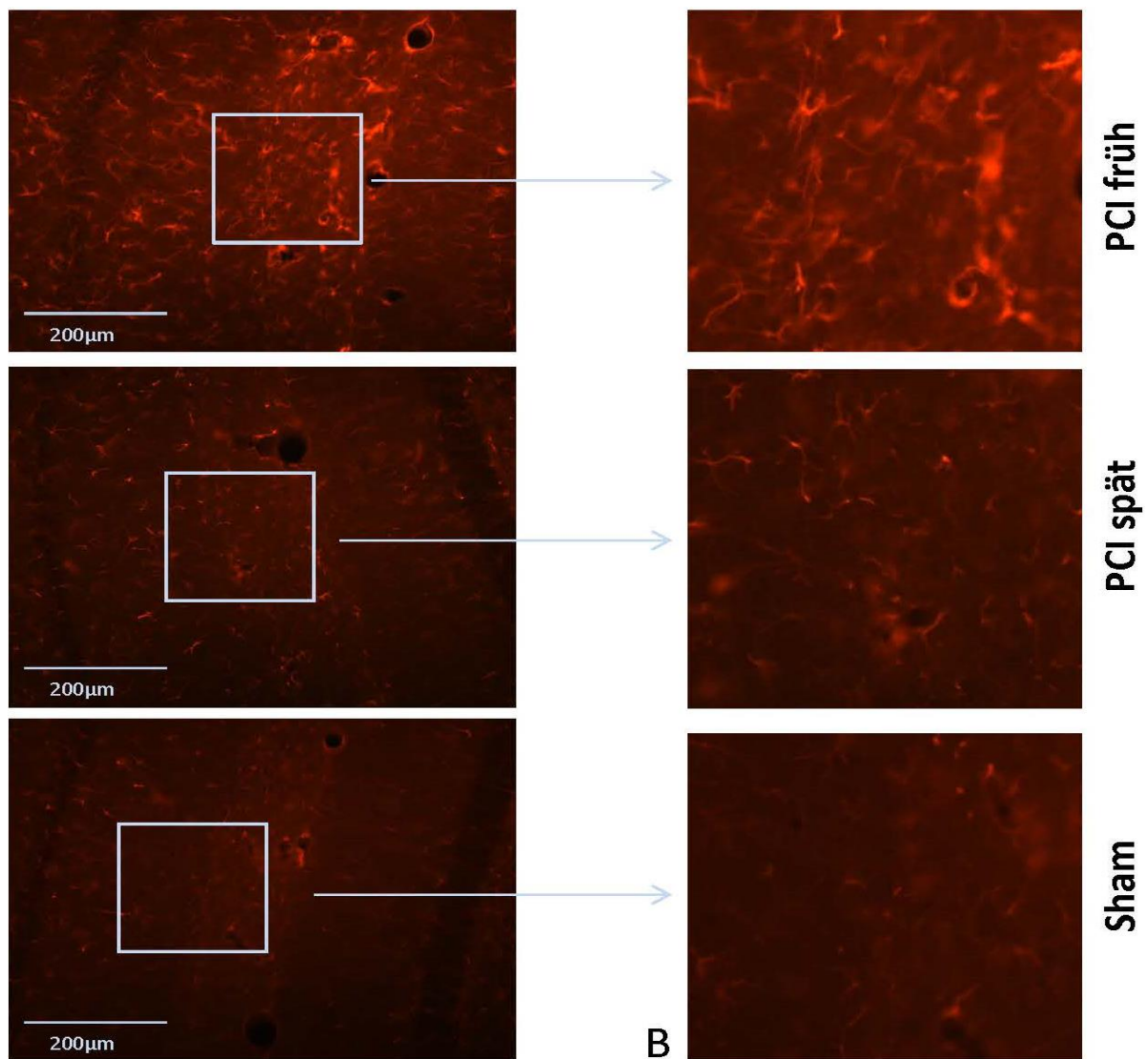
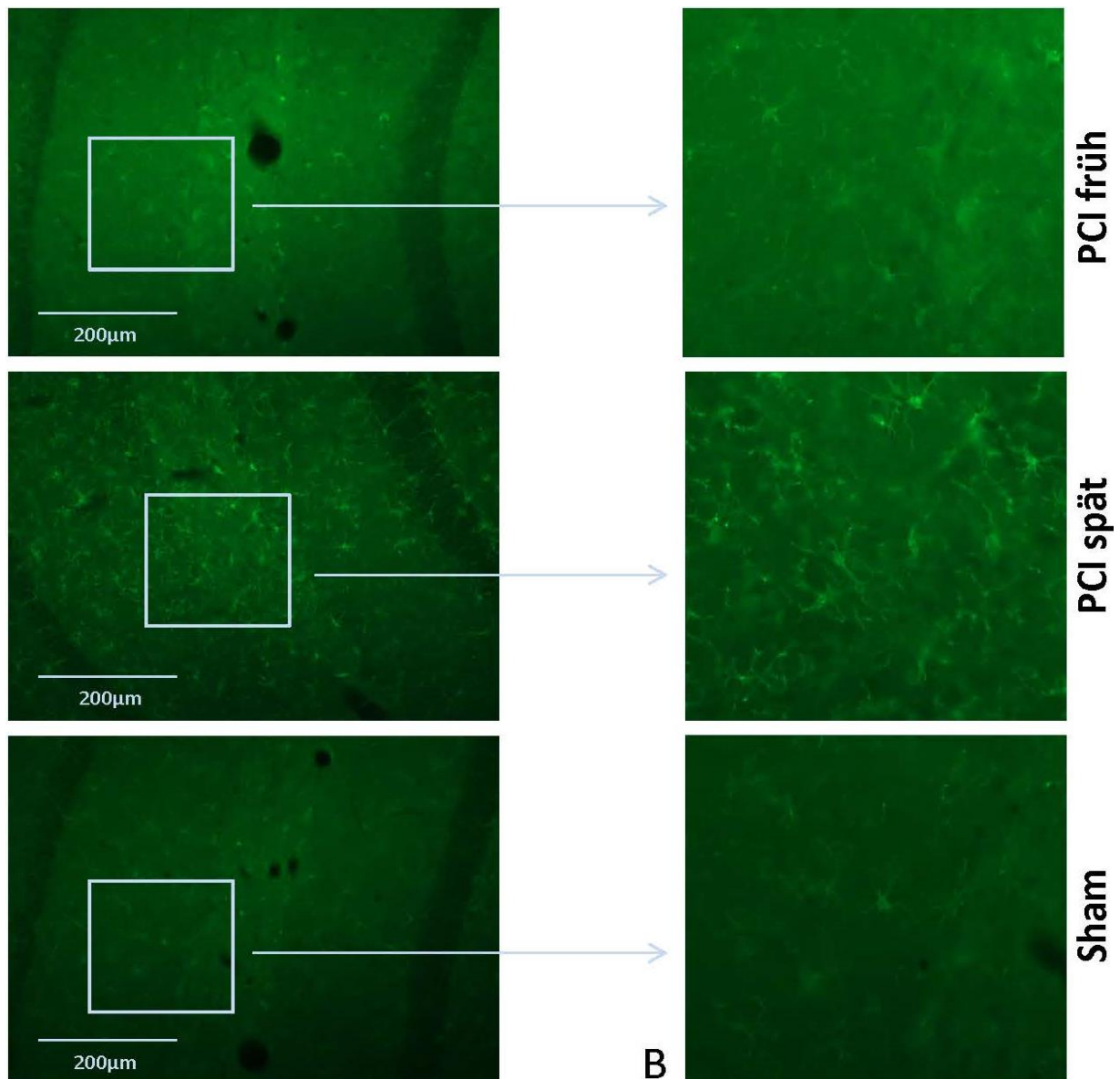


Abbildung 12 – Auswertung der Dichte der Mikroglia und Astrozyten im Hippocampus [ $1/\mu\text{m}^2$ ]



**Abbildung 13- (A): Immunfluoreszenz-Färbung der Mikroglia-Zellen in der CA1-Region des Hippocampus mittels IBA-Antikörper, Maßbalken 200µm, Vergrößerung 20fach, (B): Vergrößerter Bildausschnitt aus (A), Darstellung der einzelnen angefärbten Zellen und ihrer Verästelungen**

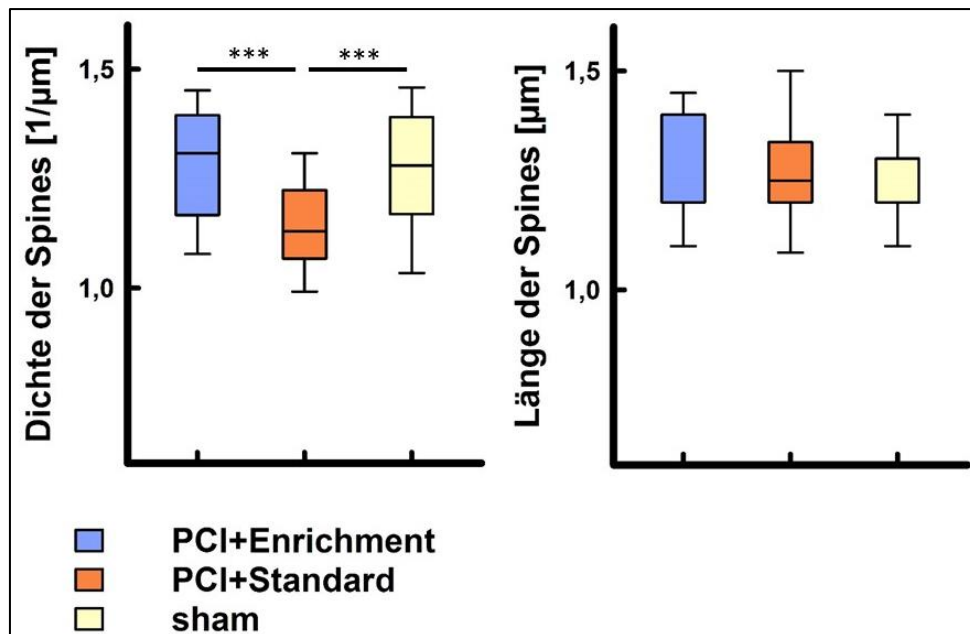


**Abbildung 14- (A): Immunfluoreszenz-Färbung der Astrozyten in der CA1-Region des Hippocampus mittels GFAP-Antikörper, Maßbalken 200µm, Vergrößerung 20fach, (B): Vergrößerter Bildausschnitt aus (A), Darstellung der einzelnen angefärbten Astrozyten und ihrer Verästelungen**

### 5.3 Golgi-Färbung

Ein Teil des Gewebes wurde im Anschluss an die Verhaltenstestung für die Spine-Analyse tertiärer Dendriten von CA1-Neuronen des Hippocampus mittels Golgi-Färbung eingefärbt. Für alle analysierten Dendriten wurde die Dichte der Spines als Anzahl der Spines pro µm ermittelt sowie eine morphologische Analyse der dendritischen Spines durchgeführt.

### 5.3.1 Erhöhung der Spine-Dichte durch EE



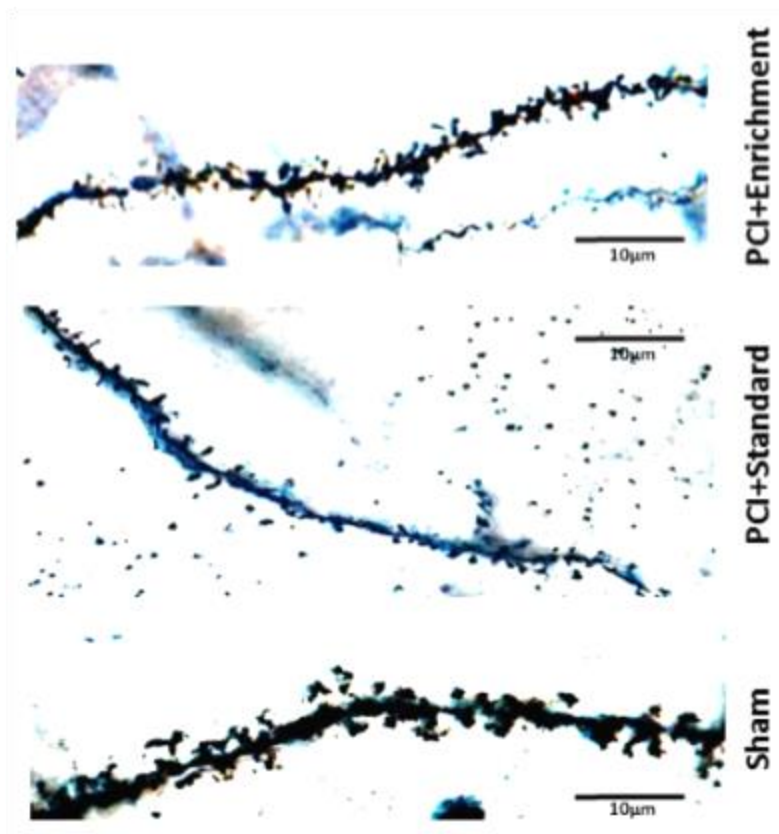
**Abbildung 15- Auswertung der Dichte und Länge der dendritischen Spines**

Für die Gruppen ergab sich hierbei eine Spine-Dichte von PCI+Enrichment = 1,285/μm, PCI+Standard = 1,142/μm und Sham = 1,269/μm. Der Unterschied zwischen PCI+Enrichment und PCI+Standard zeigt sich hierbei statistisch signifikant (\*\*\*,  $p < 0,001$ ), ebenso der Unterschied zwischen PCI+Standard und Sham (\*\*\*,  $p < 0,001$ ). Zwischen den Gruppen PCI+Enrichment und Sham konnte kein Unterschied gefunden werden (siehe Abbildung 15).

### 5.3.2 Kein Unterschied in der Spine-Länge zwischen den Versuchsgruppen

Die ermittelte durchschnittliche Länge pro Spine betrug PCI+Enrichment = 1,2μm, PCI+Standard = 1,3μm und Sham = 1,3μm. Hierbei fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 16).





**Abbildung 16- Vergleich der dendritischen Spines an hippocampalen CA1-Neuronen, Maßstab 200µm, Vergrößerung 60fach**

### 5.3.3 Erhöhte Dichte von mushroom-Spines durch EE

Im Weiteren wurde die Dichte des jeweiligen morphologischen Subtyps (mushroom, branched, thin, filamentous und stubby) pro  $\mu\text{m}$  ermittelt. Für die Dichte der mushroom-Spines ergaben sich hierbei eine signifikante Steigerung bei der EE-Gruppe,  $\text{PCI+Enrichment} = 0,113/\mu\text{m}$ ,  $\text{PCI+Standard} = 0,0759/\mu\text{m}$  und  $\text{Sham} = 0,118/\mu\text{m}$  ( $\text{PCI+Enrichment vs. PCI+Standard}^{***}$ ;  $\text{PCI+Standard vs. Sham}^{**}$ ,  $p=0,004$ ). Bei der Dichte der branched-Spines zeigten sich keine Unterschiede, sie betrug bei  $\text{PCI+Enrichment} = 0,734/\mu\text{m}$ , bei  $\text{PCI+Standard} = 0,722/\mu\text{m}$  und bei  $\text{Sham} = 0,718/\mu\text{m}$ . Für die thin-Spines ergab sich eine Dichte von  $\text{PCI+Enrichment} = 0,327/\mu\text{m}$ ,  $\text{PCI+Standard} = 0,286/\mu\text{m}$  und  $\text{Sham} = 0,307/\mu\text{m}$ , auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die filamentous-Spines zeigten eine Dichte von  $\text{PCI+Enrichment} = 0,0417/\mu\text{m}$ ,  $\text{PCI+Standard} = 0,0309/\mu\text{m}$  und  $\text{Sham} = 0,0626/\mu\text{m}$  ( $\text{PCI+Standard vs. Sham}^*$ ,  $p=0,013$ ), sie waren bei den  $\text{PCI+Standard}$ -Tieren im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant erniedrigt. Die stubby-Spines waren mit einer Dichte von  $\text{PCI+Enrichment} = 0,0245/\mu\text{m}$ ,  $\text{PCI+Standard} =$

0,01/ $\mu\text{m}$  und Sham = 0,0313/ $\mu\text{m}$  zu finden, signifikante Unterschiede ergaben sich hierbei nicht (siehe Abbildung 17).

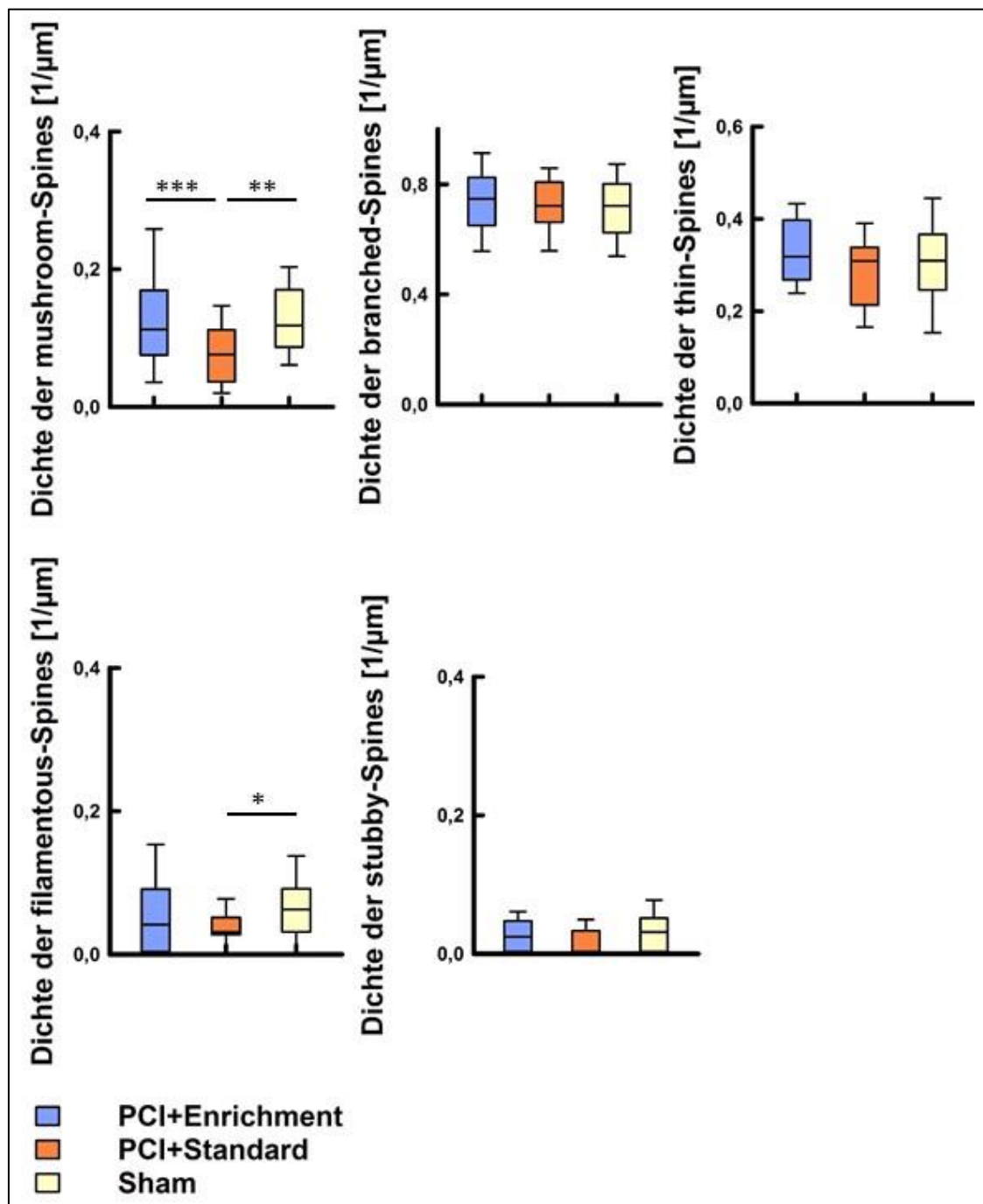
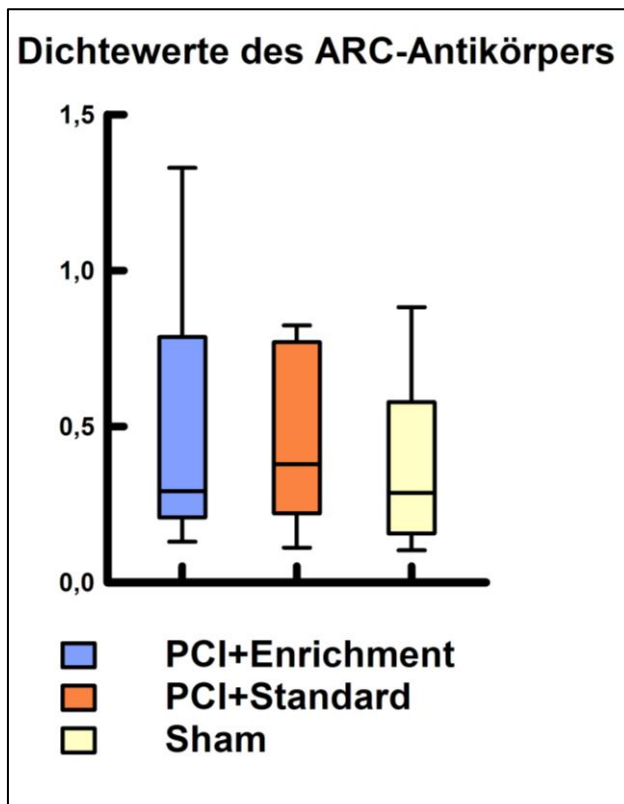


Abbildung 17- Dichte der jeweiligen morphologisch unterscheidbaren Unterformen an synaptischen Spines [1/ $\mu\text{m}$ ]



#### 5.4 Western Blot – Keine Veränderung der ARC-Expression durch EE

Ein weiterer Teil des Gewebes aus den Tieren der Verhaltenstestung wurde für Proteinbestimmungen im Hippocampus des Gehirns mittels Western Blot verwendet. Die Messung der Dichteunterschiede der Banden zur Detektion von ARC ergab folgende Werte für die einzelnen Gruppen: PCI+Enrichment = 0,293, PCI+Standard = 0,379 und Sham = 0,287. Diese Unterschiede zeigen keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 18).

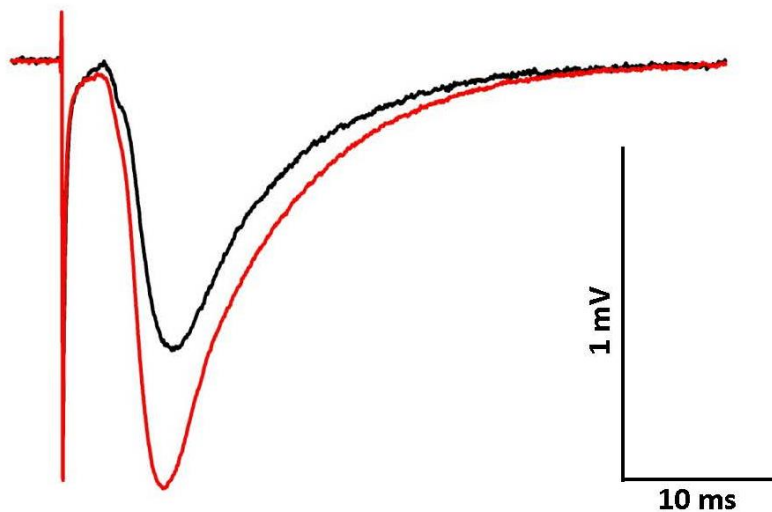


**Abbildung 18- Auswertung des ARC-Antikörper-Western Blots, densitometrische Messung der Banden**

#### 5.5 LTP-Messungen

Aufgrund methodischer Probleme ist es auch im Verlauf des Versuchs nicht gelungen, genügend Messungen aufzuzeichnen, die so stabil waren, dass sie den Qualitätskriterien des Experiments entsprochen hätten. So ist es in Einzelfällen nicht gelungen, eine stabile Baseline über einen Zeitraum von 30 Minuten aufzuzeichnen, oder es erfolgte keine hinreichende Potenzierung des Signals nach Burst-Stimulation bzw. diese Potenzierung war nicht über einen Zeitraum von 60 Minuten stabil. Eine quantitative Auswertung der LTP-Messungen zur statistischen Prüfung war somit nicht

möglich. Eine exemplarische Darstellung der gemittelten EPSP-Spur vor (schwarz) bzw. nach (rot) LTP-Induktion ist in Abbildung 19 gezeigt.



**Abbildung 19 - Exemplarische Darstellung der gemittelten EPSP-Spur; schwarz: Baseline, rot: nach LTP-Induktion**

## 6. Diskussion

### 6.1 Beurteilung der Ergebnisse der Verhaltenstests

#### 6.1.1 Beurteilung der Ergebnisse des Open Field-Tests

Um die allgemeine und lokomotorische Aktivität der Tiere zu überprüfen wurde sechs Wochen nach Sepsis-Induktion der Open Field-Test durchgeführt. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der insgesamt auf dem Testareal zurückgelegten Strecke zwischen den Versuchsgruppen und auch die in den zentralen und peripheren Zonen der Box verbrachte Zeit unterschied sich nicht. Dies deckt sich mit den Befunden anderer aktueller Studien, in denen nach ausgeheilter Sepsis keine Langzeitauswirkungen auf die allgemeine und lokomotorische Aktivität im Open Field-Test zwischen Sepsis- und Kontrolltieren nachgewiesen werden konnten (Ozcan et al. 2015). Für die weiteren Verhaltenstestungen ist dies insofern bedeutend, als dass sich ergebende Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nicht auf einen im Allgemeinen verminderten Antrieb einer Gruppe zurückzuführen sind, sondern die Unterschiede in Angstverhalten, Lern- und Gedächtnisleistung auf Veränderungen

anderer Hirnregionen, insbesondere des Amygdala-Hippocampus-Komplexes, zurückzuführen sind.

#### 6.1.2 Beurteilung der Ergebnisse des EPM

Bei dem EPM handelt es sich um einen Test, der dazu dient, das Angstverhalten von Nagern zu evaluieren. Der Konflikt bei der Exposition mit der Testapparatur entsteht darin, dass die Tiere auf der einen Seite natürlicherweise dunkle, geschützte Räume bevorzugen und zudem eine unkonditionierte Angst vor freien Flächen und Höhe besteht. Auf der anderen Seite steht der natürliche Drang neue, unbekannte Areale entdecken zu wollen (Walf und Frye 2007). In vorliegender Untersuchung unterschied sich die allgemeine Laufleistung der Gruppen, ausgedrückt durch die insgesamt zurückgelegte Strecke sowie die „number of line-crossings“, also das Umherlaufen zwischen den unterschiedlichen Armen der Versuchsapparatur, nicht. Sich ergebende Unterschiede können somit nicht auf eine in einer Versuchsgruppe insgesamt verminderte Aktivität zurückgeführt werden. Signifikante Unterschiede fanden sich in der auf dem offenen Arm verbrachten Zeit und in der auf dem geschlossenen Arm verbrachten Zeit. Die Tiere der PCI+Enrichment-Gruppe verbrachten signifikant mehr Zeit auf dem offenen Arm als die Tiere der PCI+Standard-Gruppe, für den geschlossenen Arm verhielt es sich umgekehrt. Das Angstverhalten der Versuchstiere nach Sepsis konnte also durch das EE reduziert werden, sie scheuten weniger die Exposition gegenüber einer sichtbar erhöhten und ungeschützten Umgebung. Diese Ergebnisse müssen allerdings auch in Beziehung zu den Ergebnissen aus der Sham-Gruppe betrachtet werden, denn ein signifikanter Unterschied zu einer der Interventionsgruppen ergab sich hier nicht. Dazu legen auch einige aktuelle Studien nahe, dass sich in der Langzeitbetrachtung, meist in einem Betrachtungszeitraum von 60 Tagen, keine Unterschiede im Angstverhalten nach Sepsis mehr finden (Walf und Frye 2007, Tuon et al. 2008), andere belegen eine auch in der Langzeitbeobachtung erhöhte Ängstlichkeit nach schwerer Sepsis (Anderson et al. 2015). Es könnte somit argumentiert werden, dass aufgrund der fehlenden Signifikanzen der Interventionsgruppen zu den Sham-Tieren eine Verbesserung der Ängstlichkeit allein durch das EE erreicht werden konnte. Da die Ergebnisse der Sham-Gruppe sich aber tendenziell stark an denen der PCI+Enrichment-Gruppe orientieren, insbesondere bei Betrachtung der im geschlossenen Arm verbrachten Zeit, kann an dieser Stelle angenommen werden, dass durch das kognitive Training in Form von EE eine

Annäherung des Angstverhaltens an das Ausgangsniveau der Tiere ohne Sepsis erreicht werden konnte. Für die klinische Arbeit am Patienten nach schwerer Sepsis bedeutet dies, dass auch hier ein Verhaltenstraining zur Verbesserung der psychischen Funktionen sowie der Lebensqualität erwogen werden sollte. Die aktuelle Forschung legt nahe, dass Patienten nach Sepsis verstärkt nicht nur mit kognitiven, sondern auch mit psychisch-emotionalen Einschränkungen wie Angststörungen, Depression, posttraumatischer Belastungsreaktion und Erschöpfung zu kämpfen haben (Rosendahl et al. 2013), wodurch die Lebensqualität gemindert wird (Lazosky et al. 2010). Abgeleitet aus vorliegendem Versuch könnte ein Therapieansatz für diese Patienten entwickelt werden, der ein frühzeitiges Verhaltenstraining sowie schrittweises Heranführen an Alltagstätigkeiten und soziale Kontakte sowie psychotherapeutische Aufarbeitung der belastenden Krankheitsphasen auf der Intensivstation nach durchlebter Sepsis beinhaltet.

#### 6.1.3 Beurteilung der Ergebnisse des MWM

Im MWM konnte gezeigt werden, dass die Tiere der Gruppe PCI+Enrichment das Auffinden der Plattform schneller lernten als die Tiere der Gruppe PCI+Standard: Die im Median benötigte Zeit zum Auffinden der Plattform unterschied sich zwischen den beiden Gruppen an den ersten drei Versuchstagen signifikant, am vierten Versuchstag setzte diese Tendenz sich weiter fort, bis sich ab dem fünften Versuchstag bei allen Gruppen ein Plateau ausbildete, das bis zum Ende des Versuchsprotokolls am siebten Tag gehalten wurde. Das Plateau lag bei der Gruppe PCI+Standard auf einem schlechteren Level als bei der PCI+Enrichment-Gruppe, die Tiere dieser Gruppe benötigten bis zum Versuchsende tendenziell länger zum Auffinden der Plattform als die Tiere der Gruppe, die im EE-Käfig gelebt hatten. Somit konnte durch das EE das Lernvermögen der Tiere verbessert werden, ausgedrückt durch die Zeit, die für das Auffinden der Plattform benötigt wurde. Des Weiteren konnte auch die kurzfristige Merkfähigkeit verbessert werden, ausgedrückt durch die längere Zeit, die die Gruppe PCI+Standard zum Ende des Versuchsprotokolls hin benötigte, um die Plattform zu finden.

Um das Gedächtnis der Tiere zu testen, wurde die Plattform an Tag 8 und an Tag 15 aus dem Becken entfernt, was als Recall bezeichnet wird. Es wurde die Zeit gemessen, die die Tiere auf der Suche nach ihr im NW-Quadranten verbrachten (vorherige Lokalisation der Plattform) sowie die in diesem Quadranten zurückgelegte

Strecke. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen konnten an keinem der beiden Testtage gefunden werden. An Tag 8 lag die in die im NW-Quadranten verbrachte Zeit mit ca. 21 Sekunden über dem Erwartungswert von 15 Sekunden, der sich ergeben würde, wenn die Tiere zufällig für eine Minute in dem Becken schwimmen würden. Es kann also angenommen werden, dass die Lokalisation der Plattform an diesem Tag noch erinnert wurde. An Tag 15 lag die im NW-Quadranten verbrachte Zeit in den Gruppen bei ca. 18 Sekunden und somit nur noch unwesentlich über dem Erwartungswert, es muss also angenommen werden, dass die vormalige Lokalisation der Plattform nach einer Woche von keiner der Gruppen mehr erinnert wurde. Die Aussagekraft des Tests ist am zweiten Testtag somit eingeschränkt, da es keiner der Gruppen gelang, die gestellte Aufgabe, das Wiedererinnern der Position der Plattform, zu bewältigen. Da die gestellte Aufgabe also für alle Gruppen zu schwer war, sollte für zukünftige Projekte eine Veränderung des Testprotokolls erwogen werden, um Unterschiede in der Gedächtnisleistung sensitiver nachweisen zu können. Die fehlenden Unterschiede zwischen den Gruppen, vor allem des ersten Recalls an Tag 8, lassen sich in die jüngere Forschung insofern einordnen, dass hier ähnliche Befunde zum räumlichen Gedächtnis im Langzeitverlauf nach Sepsis vorhanden sind: Einen Monat (Anderson et al. 2015) bzw. zehn Monate (Bossu et al. 2012) nach Sepsisinduktion wurden auch bei anderen Autoren im Tiermodell keine Unterschiede mehr bei der räumlichen Merkfähigkeit im MWM gefunden. Entsprechend der hier gefundenen Unterschiede im Lernverhalten konnten auch in anderen Studien mit unterschiedlichen Sepsismodellen Defizite in Tests der räumlichen Gedächtnisbildung von Versuchstieren über wenige Wochen nachgewiesen werden (Weberpals et al. 2009) (Barichello et al. 2007). Die Problematik der kognitiven Leistungsver schlechterung ist im klinischen Alltag evident und ein beträchtlicher Anteil der Patienten nach durchlebter Sepsis hat mit dementiellen Symptomen zu kämpfen (siehe hierzu auch Kapitel 3.1). Ausgehend von den vorliegenden Befunden kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass kognitives Training und aktivierende Therapiemaßnahmen möglichst bald nach durchgestandener Sepsis begonnen werden sollten um eine Langzeitverbesserung der intellektuellen Fähigkeiten zu erreichen. Des Weiteren sollten klinische Untersuchungen unternommen werden, um noch sensitivere Testverfahren für die Gedächtnisbildung zu entwickeln und effektive Präventions- und Therapiemöglichkeiten für die kognitive Verschlechterung nach durchlebter Sepsis zu erforschen.

## 6.2 Beurteilung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen

### 6.2.1 Beurteilung der IBA-Färbung

Bei der Auswertung der Dichte der Mikroglia im Hippocampus zeigte sich eine signifikante Zunahme der Dichte in der Frühphase, also drei Tage nach Sepsisinduktion, im Vergleich zu gesunden Tieren. Acht Wochen nach Sepsisinduktion bestand kein signifikanter Unterschied der Mikroglia-Dichte mehr zu gesunden Tieren. Dieser Befund zeigt zum einen, dass das hier verwendete PCI-Modell der Sepsis eine Entzündungsreaktion ortsständiger Immunzellen auch im zentralen Nervensystem induzierte. Somit kann angenommen werden, dass das hier verwendete Tiermodell zur Untersuchung der Sepsis-assoziierten Enzephalopathie prinzipiell geeignet ist. Dass die akute Entzündung zum Zeitpunkt der Durchführung der Verhaltenstests acht Wochen nach Sepsisinduktion wieder abgeklungen war, lässt darauf schließen, dass die Resultate der Verhaltenstests durch etwaige noch aktive Entzündungsaktivität nicht verfälscht wurden. Diese Befunde decken sich mit denen anderer Autoren, die eine Zunahme der Dichte von Mikroglia nach systemischer Entzündung berichten, diese morphologischen Veränderungen aber 30 Tage nach Erkrankungsbeginn nicht mehr nachweisen konnten (Gonzalez et al. 2014). Zum anderen bieten diese Ergebnisse einen Erklärungsansatz für die dauerhafte kognitive Verschlechterung nach durchlebter Sepsis: während ruhende Mikroglia über Oberflächenrezeptoren wie TLR (toll-like Rezeptoren) und PAMP (pathogen associated molecular patterns) vor allem eine überwachende Funktion und die Phagozytose von Zelldetritus und aggregierten Proteinen zur Aufgabe hat (Kettenmann et al. 2011), wirkt aktivierte Mikroglia vom M1-Typ nicht nur über die Phagozytose von Pathogenen protektiv auf das Gehirn, sondern über die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL (Interleukin)-6, IL-12 und TNF (Tumor-Nekrose Faktor) -alpha und ROS (reaktive Sauerstoff-Spezies) toxisch auf das umgebende Gewebe (Loane und Byrnes 2010). Dabei stellt die Expression der iNOS (induzierbare Stickstoffoxid-Synthetase) einen wichtigen Schädigungsmechanismus dar, das freigesetzte NO (Stickstoff-Oxid) induziert direkt den Zelltod sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen (Semmler et al. 2005). Dieser Schädigungsmechanismus hält auch mehrere Monate nach dem Entzündungsstimulus noch an und stellt damit einen möglichen Pathomechanismus für die andauernde kognitive Verschlechterung nach Sepsis dar (Weberpals et al. 2009). Des Weiteren kommt es durch reaktive Moleküle zu Axonschäden und zur

Peroxidation lipidhaltiger neuronaler Membranen (Siesjo et al. 1989), was wiederum den Untergang der Zelle zur Folge hat. Durch freie Radikale wird außerdem eine unkontrollierte Glutamatfreisetzung über die Entkopplung von NMDA-Rezeptoren in Gang gesetzt, welche über den Mechanismus der Exzitotoxizität, also einen übermäßigen Einstrom von Calcium-Ionen in die Zelle, ihrerseits die Apoptose von Neuronen induziert (Cassol-Jr et al. 2011). Die Aktivierung von Mikroglia-Zellen durch inflammatorische Stimuli kann also mit dem Verlust sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen im Hippocampus einhergehen. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die andauernden kognitiven Defizite nach durchlebter Sepsis dar.

### 6.2.2 Beurteilung der GFAP-Färbung

Bei der Auswertung der Dichte der Astrozyten im Hippocampus konnte weder in der Frühphase noch im Langzeitverlauf zwei Monate nach Sepsisinduktion ein signifikanter Unterschied zu gesunden Tieren nachgewiesen werden. Möglicher Grund hierfür ist, dass die Aktivierung von Astrozyten etwas später erfolgt als die von Mikroglia, von anderen Autoren wird ein Zeitraum von erst fünf Tagen nach Entzündungsstimulus beschrieben (Hernandes et al. 2014). Dieses Argument stützt der Befund, dass die Dichte der Astrozyten in der Spätphase zwei Monate nach Sepsisinduktion in der Tendenz höher liegt als in der Frühphase, wo sich die Werte der Gruppe PCI früh kaum von denen gesunder Tiere unterscheiden. Eine Zunahme der Astrozyten-Dichte in dieser Phase ist typisch für den Verlauf nach Schädigung des zentralen Nervensystems, aktivierte Astrozyten wandern in das geschädigte Areal ein und bilden an Stellen untergegangenen Gewebes die sogenannte Gliaarbe aus (Pekny et al. 2014). Das Ausbilden dieser Narbe dient aber nicht nur dem Füllen der entstandenen Gewebelücke, sondern hat auch protektive Effekte auf das verbliebene, noch intakte Nervengewebe: Neben zahlreichen weiteren Aufgaben verfügen Astrozyten untereinander über gap-junctions, die ihnen den gegenseitigen Austausch von Elektrolyten wie Kaliumionen ( $K^+$ ), aber auch von Glutamat ermöglichen. Dies vermindert die Apoptose durch unkontrolliert über Entkopplung von NMDA-Rezeptoren freigesetztes Glutamat, indem der Neurotransmitter und Kalziumionen gepuffert werden (Hansson et al. 2000). Zudem sind Astrozyten in der Lage, über eine erhöhte Produktion von Glutathion reaktives NO zu neutralisieren und so die Apoptose von Neuronen zu verhindern (Gegg et al. 2003). Nicht zuletzt sind Astrozyten an der Stabilisierung vorhandener interneuronaler hippocampaler Synapsen beteiligt, über

eine Erhöhung ihrer intrazellulären Kalzium-Konzentration verstärken sie die Glutamatfreisetzung bei synaptischer Aktivität zusätzlich (Araque et al. 1998). Als Faktor für die fehlende Signifikanz der Unterschiede in der Dichte der Astrozyten in den verschiedenen Phasen der Sepsis soll an dieser Stelle auch auf eine methodische Problematik bei der Auswertung hingewiesen werden: Aufgrund der sich fein verästelnden Morphologie der Astrozyten war es mit der verwendeten Software, die die Festlegung eines Thresholds erforderte, nicht immer möglich, alle Fortsätze der Zellen zu erfassen, ohne die Ergebnisse durch ein niedriges Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verfälschen. Reaktive Veränderungen in Folge der Entzündung konnten so nicht vollständig erfasst werden und eine mutmaßliche Erhöhung der Astrozyten-Dichte zumindest in der Spätphase nach Sepsis könnte auch deshalb nicht signifikant nachweisbar gewesen sein. In folgenden Arbeiten sollte die Erfassung der Zelloberfläche derart optimiert werden, dass auch die feinen Fortsätze miteinbezogen werden, um sich ergebende Unterschiede zwischen den Gruppen sensitiver nachweisen zu können.

### 6.3 Beurteilung der Ergebnisse der Golgi-Färbung

Bei der mittels Golgi-Färbung durchgeführten Analyse dendritischer Spines an den apikalen, tertiären Dendriten hippocampaler CA1-Neurone zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Spine-Dichte in der Gruppe PCI+Enrichment im Vergleich zu PCI+Standard. Zudem war die Dichte in der Gruppe PCI+Standard im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant reduziert. Diese Ergebnisse decken sich mit dem Befund, dass sich die Spine-Dichte infolge einer Sepsis verringert (Kondo et al. 2011), was als mögliches morphologisches Korrelat des Lern- und Gedächtnisdefizits nach systemischer Inflammation angesehen werden kann, da die Langzeitkonsolidierung von Gedächtnisinhalten mit einer Erhöhung der Dichte dendritischer Spines einher geht (Wartman und Holahan 2014). Eine Erniedrigung der Dichte kann somit ein morphologischer Hinweis auf eine Störung der Gedächtnisleistung sein. Da es sich bei dendritischen Spines um die Orte der exzitatorischen Synapsen im Hippocampus handelt (Harris und Kater 1994), ist eine Erhöhung der Spine-Dichte, wie im Versuch durch das EE nach Sepsis geschehen, im Umkehrschluss morphologisches Korrelat einer Verstärkung der synaptischen Aktivität im Hippocampus. Die Stabilität von synaptischen Verbindungen ist allerdings nicht nur durch die Dichte der Spines charakterisiert, sondern auch durch deren Morphologie. Es wurde deshalb auch die



Verteilung der verschiedenen Unterformen synaptischer Spines in vorliegender Arbeit analysiert. Die Unterscheidung erfolgte in fünf Kategorien: mushroom, thin, branched, stubby und filamentous. Es ist bekannt, dass Spines sich im Laufe der Maturation des Gehirns stabilisieren und dass filamentöse Spines die unreifste Form der dendritischen Spines darstellen und nur vorübergehend vorhanden sind, da sie sich durch Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts zu reiferen Spine-Formen weiterentwickeln (Dent et al. 2007). Auch die thin- und branched-Spines stellen oft nur eine vorübergehende Form dar. Sie unterliegen einem hohen Turn-Over, der durch synaptische Aktivität getriggert ist, haben aber aufgrund der hohen Zahl an NMDA-Rezeptoren in ihrer postsynaptischen Verdichtung das Potential, nach Kalzium-Einstrom, darauf folgenden, nachgeschalteten Signalwegen und schließlich durch vermehrte Insertion von AMPA-Rezeptoren zu stabileren Synapsen zu reifen (Holtmaat und Svoboda 2009). Mushroom-Spines dagegen zeigen sich relativ stabil, der Bereich der postsynaptischen Verdichtung ist größer und sie haben bereits eine hohe Anzahl von AMPA-Rezeptoren als Zeichen einer starken synaptischen Aktivität. Zudem sind sie durch das Vorhandensein von glattem endoplasmatischem Retikulum auch zur lokalen Regulation der Kalzium-Konzentration sowie durch das Vorhandensein von Polyribosomen zur lokalen Proteinsynthese befähigt (Losonczy et al. 2008, Noguchi et al. 2005). Über stubby-Spines ist bisher wenig bekannt, auch sie gelten als unreife Form der dendritischen Fortsätze und sind vor allem im heranwachsenden Gehirn, kaum aber im adulten, zu finden (Petrak et al. 2005). In dieses Wissen lassen sich die Befunde der vorliegenden Spine-Analyse insofern einordnen, dass hier in der Gruppe PCI+Standard eine signifikante Erniedrigung der mushroom-Spine-Dichte im Vergleich zu PCI+Enrichment und Sham gezeigt werden konnte. Nach PCI+ Enrichment fand sich dagegen kein Unterschied mehr zu dem Anteil der mushroom –Spines im Vergleich zu Sham-Tieren. Dies spricht zum einen dafür, dass nach durchlebter Sepsis eine veränderte synaptische Transmission im Hippocampus persistiert, da sich weniger reife Synapsen in Form von mushroom-Spines finden. Zum zweiten sprechen die Ergebnisse dafür, dass durch das EE eine Rehabilitation der synaptischen Transmission erreicht werden konnte, so dass sich nun wieder stabilere und elektrophysiologisch stärkere synaptische Verbindungen im Hippocampus ausgebildet haben, deren Dichte mit derer von Sham-Tieren und somit mit dem Zustand vor Sepsis vergleichbar ist. Da der Hippocampus im Gehirn die Region des räumlichen Lernens abbildet, stimmt dieser Befund auch mit den Ergebnissen aus dem MWM überein, wo

die Tiere der Gruppe PCI+Enrichment ein besseres Lernvermögen zeigten. Die signifikante Erniedrigung der Dichte der filamentous-Spines in der Gruppe PCI+Standard im Vergleich zu Sham und tendenziell auch im Vergleich zu PCI+Enrichment deutet darauf hin, dass die Synaptogenese und somit die synaptische Plastizität im Allgemeinen durch die Sepsis vermindert ist. Der fehlende Unterschied zwischen PCI+Enrichment und Sham deutet aber darauf hin, dass dieses Defizit durch das EE wieder behoben werden kann. Fehlende Unterschiede in der Anzahl der stubby-Spines sind darauf zurückzuführen, dass diese hauptsächlich während der Reifung des Gehirns vorkommen und sich im ausgewachsenen Hirn kaum noch finden (Fiala et al. 1998). Als problematisch bei vorliegender Analyse erwies sich die Unterscheidung zwischen thin- und branched-Spines: aufgrund der nur zweidimensionalen Darstellung der Dendriten unter dem Lichtmikroskop konnte eine korrekte Differenzierung zwischen den beiden Typen nicht immer erfolgen, da eine Einschätzung, ob zwei benachbarte Spine-Köpfe einen gemeinsamen Ursprung am Dendriten haben oder nicht, ohne dritte Dimension nicht immer eindeutig möglich war. Dies führte dazu, dass die Dichte der branched-Spines im Vergleich zur Literatur über- und die der thin-Spines im Vergleich unterschätzt wurde. Da es sich bei beiden Formen jedoch um eher unreife, wenig stabile Typen von Spines handelt und sich die Morphologie ihrer postsynaptischen Dichten und auch deren Funktion ähneln, beeinflusst dies die Aussagekraft der übrigen Befunde nicht (Harris et al. 1992). Zudem fanden sich zwischen den Versuchsgruppen bei der Dichte beider Spine-Arten keine Unterschiede, aufgrund der methodischen Problematik sollte dieses Ergebnis aber nicht weiter diskutiert werden. Die Länge der dendritischen Spines unterschied sich zwischen den Gruppen nicht, dies lässt sich dadurch erklären, dass in allen drei Gruppen die in ihrer Länge recht homogenen thin- und branched-Spines mit über vier Fünftel den größten Teil der analysierten Spines darstellten und so die kürzeren (mushroom und stubby) und längeren (filamentous) Spineformen bei dieser Form der Auswertung wenig ins Gewicht fielen und hier somit keine Signifikanzen erreicht werden konnten.

## 6.4 Beurteilung der Ergebnisse des Western Blots

### 6.4.1 Beurteilung der Ergebnisse des ARC-Antikörpers

Das ARC-Protein gehört zur Gruppe der IEG (immediate early genes). Charakteristisch für diese Gruppe von Genen ist, dass ihre Transkription in Reaktion auf einen Stimulus sofort gesteigert wird, was durch die darauf folgenden Mechanismen eine Etablierung von Langzeitkonsolidierung bewirken kann (Okuno 2011). Da das ARC-Protein zu den bisher am besten charakterisierten aus der Gruppe der IEG gehört und eine Schlüsselrolle in zahlreichen molekularen Mechanismen einnimmt, die die synaptische Plastizität ermöglichen, wurde es an dieser Stelle ausgewählt, um den Einfluss des EE auf Lernen und Gedächtnis nach schwerer Sepsis zu untersuchen. Das ARC-Protein und die zugehörige mRNA sind nur postsynaptisch zu finden und werden dort in Folge gesteigerter synaptischer Aktivität, etwa durch LTP-Induktion, verstärkt translatiert sowie zeitverzögert im Nukleus verstärkt transkribiert. Es sind derzeit mehrere Mechanismen bekannt, durch die ARC Einfluss auf die synaptische Plastizität nimmt: die Lokalisation von ARC ist im Neuron streng reguliert, es findet sich im Nukleus, in den Dendriten und in den Spines, also in den Kompartimenten des Neurons, in denen sich die morphologischen Änderungen nach synaptischer Aktivität vollziehen (Rodriguez et al. 2005). Es erhöht durch Interaktion mit Dynamin und Endophilin die Endozytose von AMPA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran (Chowdhury et al. 2006) und spielt somit eine wichtige Rolle beim „homeostatic synaptic scaling“, einer Form der Plastizität, bei der die Erregbarkeit eines Neurons wieder in den physiologischen Bereich reguliert und somit relativiert wird, ohne jedoch die Veränderungen an der einzelnen Synapse durch die vorherige Stimulation, etwa durch Induktion von LTP, zu beeinflussen (Gao et al. 2010). Des Weiteren wird durch ARC die Spine-Dichte erhöht und die Spine-Morphologie beeinflusst. Indem ARC mit dem Aktin des Zytoskeletts interagiert, werden morphologische Änderungen des Neurons und der Synapse stabilisiert (Dillon und Goda 2005). Es findet sich insbesondere in den thin-Spines, einer Spine-Form die als synaptisch schwach charakterisiert ist, und stabilisiert diese als „learning“ (Lern)-Spines bekannten Fortsätze, sodass reifere „memory“ (Gedächtnis)-mushroom-Spines entstehen können (Peebles et al. 2010)(siehe hierzu auch Kapitel 6.3). Außerdem hat ARC eine verstärkende Wirkung auf die Expression von Notch1. Dieser

Rezeptor ist im adulten wie auch im sich entwickelnden Gehirn an morphologischen Veränderungen nach synaptischer Aktivität beteiligt (Alberi et al. 2011).

Die bisherige Forschung konnte bereits zeigen, dass EE die Menge des ARC-Proteins im Kortex und in geringerem Ausmaß auch im Hippocampus erhöht (Pinaud et al. 2001) und dass es nach Sepsis-assoziiierter Enzephalopathie vermindert ist (Anderson et al. 2015). Angenommen wurde somit, dass es im vorliegenden Experiment zu einer Verminderung von ARC in der PCI+Standard-Gruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe kommt und diese Reduktion in der PCI+Enrichment-Gruppe aufgrund des EE behoben wird. Diese Hypothese konnte allerdings nicht bestätigt werden, es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Erklärt werden kann die fehlende Verminderung des ARC-Proteins in den PCI-Gruppen möglicherweise durch den langen Zeitraum zwischen Infektion und Protein-Analyse, der Zeitraum betrug in vorliegender Arbeit mindestens acht Wochen, bisherige Forschung untersuchte die Tiere maximal vier Wochen nach Infektion. Es wird also gefolgert, dass die Unterschiede des Vorkommens von ARC im Hippocampus sich im Laufe der Rehabilitationsphase zurückbilden und nach vollständiger Genesung im Langzeitverlauf nicht mehr nachweisbar sind. Eine ähnliche Erklärung kann auch für das fehlende Ansteigen von ARC durch das EE angenommen werden: in Reaktion auf einen LTP-induzierenden Stimulus wird ARC-mRNA innerhalb von vier Minuten lokal verstärkt translatiert (Ramirez-Amaya et al. 2005) und innerhalb von 30 Minuten verlässt neu transkribierte ARC-mRNA den Nukleus (Rao et al. 2006). Die unmittelbar einsetzenden ARC-vermittelten Mechanismen sind zeitlich allerdings durch Ubiquitinylierung und Abbau des Proteins im Proteasom nach sechs Stunden limitiert (Greer et al. 2010). Dies ist nötig, um die neuronale Homöostase nicht zu überfordern, denn dauerhaft erhöhte ARC-Level gehen ihrerseits wieder mit einer Verschlechterung des räumlichen Lernvermögens einher (Rosi et al. 2009). Die fehlende Erhöhung von ARC in vorliegender Arbeit im Vergleich zu bereits vorhandenen Forschungsergebnissen lässt sich also vor allem durch die unterschiedlichen EE-Protokolle erklären: die Tiere wurden dem EE in anderen Protokollen meist nur intermittierend ausgesetzt und die Gewebeentnahme erfolgte unmittelbar nach der letzten Exposition, also innerhalb des Zeitfensters, in dem ARC noch erhöht ist, wohingegen in vorliegendem Protokoll die Tiere dem EE dauerhaft ausgesetzt waren und eine Veränderung der Umgebung wöchentlich erfolgte, nicht jedoch unmittelbar vor der Gewebeentnahme. In vorliegender Arbeit ist es gelungen, die funktionell wichtigen

morphologischen Veränderungen der dendritischen Spines sowie die verminderte Ängstlichkeit im EPM und die bessere Lernfähigkeit im MWM nachzuweisen. Es ist anzunehmen, dass diese beständigen und über einen Zeitraum von acht Wochen stabilisierten Veränderungen unter Mitwirkung von ARC während der frühen Zeit des EE mitverursacht wurden, aufgrund des späten Untersuchungszeitpunktes im Western Blot konnte das akut wirksame Effektorprotein ARC aber dann nicht mehr in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden.

## 6.5 Beurteilung der LTP-Messungen

Bei der Durchführung der LTP-Messungen ist es nicht gelungen, die Methode bis zum Versuchsende derart zu etablieren, um eine hinreichende Anzahl an qualitativ geeigneten Messungen für eine quantitative Auswertung aufzuzeichnen. Problematisch stellten sich hierbei vor allem zwei Aspekte dar: die Temperatur des Wasserbades sowie dessen pH-Wert. Beide Parameter beeinflussen die Geschwindigkeit biochemischer Prozesse in den Neuronen und können schon bei leichten Abweichungen von physiologischen Werten deutliche Veränderungen der synaptischen Übertragung zur Folge haben. Bezüglich der Temperatur in der Messkammer bestand das Problem darin, dass Lösung 2, die in einem separaten Wasserbad vorgewärmt wurde, die Schläuche zur Messkammer nur mit der geringen Geschwindigkeit von etwa 3,5 ml/min passieren konnte, um durch das Tropfen in die Messkammer die empfindliche Messelektrode nicht zu stören. Die Lösung kühlte deshalb auf ihrem Weg durch die Zirkulation auf Werte um ca. 25°C ab. Bei dieser Temperatur ist davon auszugehen, dass die synaptische Transmission und v.a. die Plastizität gestört sind. Dies erklärt, warum oftmals keine ausreichende Stabilität des EPSP über die Zeit der Baseline-Aufzeichnung erreicht werden konnte. Bei dieser Temperatur ist außerdem nicht zu erwarten, dass Prozesse, die in Neuronen in Reaktion auf einen LTP-induzierenden Stimulus auftreten, wie ein veränderter Rezeptoreinbau in Membranen oder De-novo-Proteinsynthese (Raymond 2007), ablaufen. Zusammen mit dem über die Zeit weiter zunehmenden Untergang von Neuronen erklärt dieses temperaturbedingte vermeintliche Ausbleiben biochemischer Prozesse, warum nach der Burst-Stimulation keine stabile LTP des EPSP über 60 Minuten erreicht werden konnte. Dieses Problem konnte erst im Verlauf des Versuchs durch das Einbringen thermostabilerer Schläuche sowie einer Badheizung unmittelbar vor der Messkammer behoben werden. Ein weiteres Problem stellte das

temperaturbedingte Absinken des pH-Wertes in der Messkammer von den beim Anfertigen der Lösung 2 eingestellten 7,4 auf bis zu 7,0 in der Messkammer dar. Der pH-Wert beeinflusst intrazelluläre Prozesse, da sich Proteinstrukturen in der Zelle abhängig vom Ionenmilieu verändern und so die reaktiven Zentren von Enzymen zerstört werden. Stoffwechselprozesse der Zelle können nicht mehr ablaufen und es kommt wiederum zum Untergang von Neuronen im Hirnschnitt. Eine Besserung dieses Problems wurde erreicht, indem die Lösung im Aufbewahrungsgefäß im Kreislauf basischer eingestellt wurde, auf einen pH-Wert von etwa 7,6, sodass ein Absinken im Verlauf der Zirkulation besser toleriert werden konnte. Durch das zusätzliche Einbringen der Badheizung unmittelbar vor der Messkammer konnten die Schwankungen des pH-Wertes im Wasserbad zumindest eingedämmt und so im Versuchsverlauf stabilere Messungen erzielt werden, deren Anzahl allerdings nicht ausreichte, um eine quantitative Analyse der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen durchzuführen.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus der Verhaltenstestung sowie der Golgi-Färbungen, die eine Veränderung der Lernleistung durch EE im MWM sowie morphologische Veränderungen an den Synapsen zeigten, sind auch Veränderungen in der LTP hippocampaler Neurone zu erwarten, die durch eine Sepsis-assoziierte Enzephalopathie geschädigt wurden. Eine Zunahme der LTP geschädigter hippocampaler Neurone durch die Methode des EE ist bereits für andere Erkrankungen wie die Alzheimer-Erkrankung (Li et al. 2013) und in der Rekonvaleszenz nach Schlaganfall (Mahati et al. 2016) gezeigt worden. Es ist nun in folgenden Projekten der Arbeitsgruppe zu prüfen, ob auch für die Sepsis Befunde erhoben werden, die die Wirksamkeit des EE nach Sepsis-assoziiierter Enzephalopathie elektrophysiologisch weiter untermauern.

## 6.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in vorliegender Arbeit am Tiermodell durch EE gezeigt werden, dass die kognitiven Defizite, die nach überlebter Sepsis und damit einhergehender Entzündungsreaktion im zentralen Nervensystem auftreten, durch kognitives Training teilweise verbessert werden können.

In der Verhaltenstestung konnte gezeigt werden, dass die Ängstlichkeit der Tiere im EPM durch das EE im Vergleich zu Tieren, die nach Sepsis in Standard-Käfigen

untergebracht waren, signifikant vermindert werden konnte. Da es im klinischen Alltag nach Sepsis nicht nur zu einer langfristigen Verschlechterung kognitiver Fähigkeiten, sondern oft auch zu psychisch-emotionalen Störungen wie Angststörungen, Depressionen und posttraumatischen Belastungsstörungen kommt, könnte der Einfluss des EE im Tiermodell einen Hinweis darauf geben, dass kognitives Training in der Rehabilitationsphase nach Sepsis einen positiven Einfluss auch auf diese Krankheitsbilder haben kann, was in Zukunft Gegenstand vor allem klinischer Studien werden sollte, um die Lebensqualität der Betroffenen rasch zu steigern. Im MWM konnte gezeigt werden, dass durch EE die Lernfähigkeit der Tiere nach Sepsis verbessert werden konnte. Dieser Befund lässt hoffen, dass auch Sepsis-Patienten von kognitivem Training profitieren. Dies sollte zukünftig ebenfalls Bestandteil der klinischen Sepsis-Forschung werden, um die Symptomatik der Betroffenen zu reduzieren und ihnen so langfristig wieder ein selbstständiges Leben zu ermöglichen. Der Nachweis einer verbesserten Merkfähigkeit konnte in vorliegender Arbeit nicht erbracht werden, in der Nachbetrachtung ist dies vor allem auf das verwendete Testprotokoll im MWM zurückzuführen. Da es im zweiten Recall an Tag 15 keiner der Versuchsgruppen mehr gelang, die Position der Plattform zu erinnern, ist davon auszugehen, dass die gestellte Aufgabe zur Überprüfung des Langzeitgedächtnisses die Fähigkeiten der Tiere übersteigt. Insgesamt ist nun in klinischen Studien zu prüfen, ob das kognitive Training im Rehabilitationsprogramm nach Sepsis eine Verbesserung des Lernens, der Merkfähigkeit sowie des Gedächtnisses bewirkt.

Auch die morphologischen Untersuchungen der synaptischen Spines sprechen für die Wirksamkeit des EE: es konnte sowohl eine signifikant erhöhte Dichte der dendritischen Spines der Gruppe PCI+Enrichment im Vergleich zu PCI+Standard als auch eine signifikante Verminderung der unreifen filamentous-Spines zwischen PCI+Standard und Sham-Tieren gezeigt werden. Außerdem kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Dichte von funktionell stabileren mushroom-Spines in der Gruppe PCI+Enrichment im Vergleich zu PCI+Standard durch die Intervention. Da es sich bei mushroom-Spines um langlebige dendritische Fortsätze handelt, die mit ihrer großen Zahl an AMPA-Rezeptoren als Orte stabiler, andauernder synaptischer Transmission angesehen werden, ist davon auszugehen, dass sie ein morphologisches Korrelat für die in der Verhaltenstestung erbrachten besseren Resultate der Enrichment-Gruppe darstellen.

Neben einer systematischen Evaluierung des kognitiven Trainings nach Sepsis in der Rehabilitation von Sepsis-Patienten sollte weitere experimentelle Forschung auf diesem Gebiet erfolgen. Hier sollte die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Messung von LTP im Hippocampus an Tieren durchgeführt werden, die nach Sepsis einem EE ausgesetzt waren, um die Ursache der kognitiven Defizite und ihre Beeinflussbarkeit durch EE neben der morphologischen auch aus der elektrophysiologischen Sicht besser beschreiben zu können. Im Weiteren sollten tiefergehende Studien zu Sepsis-induzierten molekularen Veränderungen an zentralen Synapsen erfolgen, um geeignete Zielproteine zu identifizieren, die ursächlich für die beschriebenen Prozesse einer gestörten Plastizität nach Sepsis sein können. Dies könnte dazu führen, direkte und Hypothesen-gesteuerte Behandlungsmethoden für Patienten nach Sepsis zu entwickeln.



## 7. Literaturverzeichnis

- Alberi L, Liu S, Wang Y, Badie R, Smith-Hicks C, Wu J, Pierfelice TJ, Abazyan B, Mattson MP, Kuhl D, Pletnikov M, Worley PF, Gaiano N. 2011. Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. *Neuron*, 69 (3):437-444.
- Anderson ST, Commins S, Moynagh PN, Coogan AN. 2015. Lipopolysaccharide-induced sepsis induces long-lasting affective changes in the mouse. *Brain Behav Immun*, 43:98-109.
- Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG. 1998. Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor-dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, 18 (17):6822-6829.
- Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. 2007. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res*, 40 (6):831-837.
- Bossu P, Cutuli D, Palladino I, Caporali P, Angelucci F, Laricchiuta D, Gelfo F, De Bartolo P, Caltagirone C, Petrosini L. 2012. A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF-alpha and IL-18. *J Neuroinflammation*, 9:101.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. 2005. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov*, 4 (10):854-865.
- Cassol-Jr OJ, Comim CM, Constantino LS, Rosa DV, Mango LA, Stertz L, Kapczinski F, Romano-Silva MA, Quevedo J, Dal-Pizzol F. 2011. Acute low dose of MK-801 prevents memory deficits without altering hippocampal DARPP-32 expression and BDNF levels in sepsis survivor rats. *J Neuroimmunol*, 230 (1-2):48-51.
- Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, Kuhl D, Huganir RL, Worley PF. 2006. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 52 (3):445-459.
- Das G, Reuhl K, Zhou R. 2013. The Golgi-Cox method. *Methods Mol Biol*, 1018:313-321.
- DeFries JC, Hegmann JP, Weir MW. 1966. Open-field behavior in mice: evidence for a major gene effect mediated by the visual system. *Science*, 154 (3756):1577-1579.

- Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, Philippar U, Barzik M, Robinson DA, Gupton S, Van Veen JE, Furman C, Zhang J, Alberts AS, Mori S, Gertler FB. 2007. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol*, 9 (12):1347-1359.
- Dillon C, Goda Y. 2005. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci*, 28:25-55.
- Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med*, 33 (4):606-618.
- Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. 1998. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci*, 18 (21):8900-8911.
- Gao M, Sossa K, Song L, Errington L, Cummings L, Hwang H, Kuhl D, Worley P, Lee HK. 2010. A specific requirement of Arc/Arg3.1 for visual experience-induced homeostatic synaptic plasticity in mouse primary visual cortex. *J Neurosci*, 30 (21):7168-7178.
- Garthe A, Roeder I, Kempermann G. 2016. Mice in an enriched environment learn more flexibly because of adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*, 26 (2):261-271.
- Gegg ME, Beltran B, Salas-Pino S, Bolanos JP, Clark JB, Moncada S, Heales SJ. 2003. Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem*, 86 (1):228-237.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M. 2011. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res*, 170 (1):e123-134.
- Gonzalez H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R. 2014. Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol*, 274 (1-2):1-13.
- Gortz N, Lewejohann L, Tamm M, Ambree O, Keyvani K, Paulus W, Sachser N. 2008. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behav Brain Res*, 191 (1):43-48.
- Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, Mardinly AR, Lipton DM, Flavell SW, Kim TK, Griffith EC, Waldon Z, Maehr R, Ploegh HL, Chowdhury S, Worley PF, Steen J, Greenberg ME. 2010. The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell*, 140 (5):704-716.
- Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Ronnback L. 2000. Astroglia and glutamate in physiology and

- pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int*, 37 (2-3):317-329.
- Harati H, Barbelivien A, Herbeaux K, Muller MA, Engeln M, Kelche C, Cassel JC, Majchrzak M. 2013. Lifelong environmental enrichment in rats: impact on emotional behavior, spatial memory vividness, and cholinergic neurons over the lifespan. *Age (Dordr)*, 35 (4):1027-1043.
- Harris KM, Kater SB. 1994. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*, 17:341-371.
- Harris KM, Jensen FE, Tsao B. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci*, 12 (7):2685-2705.
- Hernandes MS, D'Avila JC, Trevelin SC, Reis PA, Kinjo ER, Lopes LR, Castro-Faria-Neto HC, Cunha FQ, Britto LR, Bozza FA. 2014. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. *J Neuroinflammation*, 11:36.
- Herring A, Ambree O, Tomm M, Habermann H, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. 2009. Environmental enrichment enhances cellular plasticity in transgenic mice with Alzheimer-like pathology. *Exp Neurol*, 216 (1):184-192.
- Holtmaat A, Svoboda K. 2009. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*, 10 (9):647-658.
- Hopkins RO, Herridge MS. 2006. Quality of life, emotional abnormalities, and cognitive dysfunction in survivors of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med*, 27 (4):679-689; abstract x.
- Jankowsky JL, Melnikova T, Fadale DJ, Xu GM, Slunt HH, Gonzales V, Younkin LH, Younkin SG, Borchelt DR, Savonenko AV. 2005. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 25 (21):5217-5224.
- Jurgens HA, Johnson RW. 2012. Environmental enrichment attenuates hippocampal neuroinflammation and improves cognitive function during influenza infection. *Brain Behav Immun*, 26 (6):1006-1016.
- Kao LT, Sheu JJ, Lin HC, Tsai MC, Chung SD. 2015. Association between sepsis and dementia. *J Clin Neurosci*, 22 (9):1430-1433.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91 (2):461-553.
- Kondo S, Kohsaka S, Okabe S. 2011. Long-term changes of spine dynamics and microglia after transient peripheral immune response triggered by LPS in vivo. *Mol Brain*, 4:27.

- Korb E, Finkbeiner S. 2011. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci*, 34 (11):591-598.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259):680-685.
- Lazosky A, Young GB, Zirul S, Phillips R. 2010. Quality of life after septic illness. *J Crit Care*, 25 (3):406-412.
- Li S, Jin M, Zhang D, Yang T, Koeglsperger T, Fu H, Selkoe DJ. 2013. Environmental novelty activates beta2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by Abeta oligomers. *Neuron*, 77 (5):929-941.
- Loane DJ, Byrnes KR. 2010. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*, 7 (4):366-377.
- Losonczy A, Makara JK, Magee JC. 2008. Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature*, 452 (7186):436-441.
- Mahati K, Bhagya V, Christofer T, Sneha A, Shankaranarayana Rao BS. 2016. Enriched environment ameliorates depression-induced cognitive deficits and restores abnormal hippocampal synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem*.
- Nithianantharajah J, Hannan AJ. 2006. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 7 (9):697-709.
- Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H. 2005. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron*, 46 (4):609-622.
- Okuno H. 2011. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neurosci Res*, 69 (3):175-186.
- Otto GP, Grunwald B, Geis C, Kothe S, Hurtado-Oliveros J, Chung HY, Ekaney M, Bockmeyer CL, Sossdorf M, Busch M, Claus RA. 2015. Impact of antibiotic treatment intensity on long-term sepsis-associated kidney injury in a polymicrobial peritoneal contamination and infection model. *Nephron*, 129 (2):137-142.
- Ozcan PE, Senturk E, Orhun G, Gumru S, Arican N, Orhan N, Yilmaz CU, Kaya M, Aricioglu F, Esen F. 2015. Effects of intravenous immunoglobulin therapy on behavior deficits and functions in sepsis model. *Ann Intensive Care*, 5 (1):62.
- Pandharipande PP, Girard TD, Ely EW. 2014. Long-term cognitive impairment after critical illness. *N Engl J Med*, 370 (2):185-186.
- Parker MM, Parrillo JE. 1983. Septic shock. Hemodynamics and pathogenesis. *Jama*, 250 (24):3324-3327.

- Peebles CL, Yoo J, Thwin MT, Palop JJ, Noebels JL, Finkbeiner S. 2010. Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (42):18173-18178.
- Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*, 565:30-38.
- Petrak LJ, Harris KM, Kirov SA. 2005. Synaptogenesis on mature hippocampal dendrites occurs via filopodia and immature spines during blocked synaptic transmission. *J Comp Neurol*, 484 (2):183-190.
- Pham TM, Winblad B, Granholm AC, Mohammed AH. 2002. Environmental influences on brain neurotrophins in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 73 (1):167-175.
- Pinaud R, Penner MR, Robertson HA, Currie RW. 2001. Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment: implications for molecular plasticity. *Brain Res Mol Brain Res*, 91 (1-2):50-56.
- Pope SK, Shue VM, Beck C. 2003. Will a healthy lifestyle help prevent Alzheimer's disease? *Annu Rev Public Health*, 24:111-132.
- Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA. 2005. Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci*, 25 (7):1761-1768.
- Rao VR, Pintchovski SA, Chin J, Peebles CL, Mitra S, Finkbeiner S. 2006. AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Nat Neurosci*, 9 (7):887-895.
- Raymond CR. 2007. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the "long" in long-term potentiation. *Trends Neurosci*, 30 (4):167-175.
- Risher WC, Ustunkaya T, Singh Alvarado J, Eroglu C. 2014. Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. *PLoS One*, 9 (9):e107591.
- Rodriguez JJ, Davies HA, Silva AT, De Souza IE, Peddie CJ, Colyer FM, Lancashire CL, Fine A, Errington ML, Bliss TV, Stewart MG. 2005. Long-term potentiation in the rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia. *Eur J Neurosci*, 21 (9):2384-2396.
- Rosendahl J, Brunkhorst FM, Jaenichen D, Strauss B. 2013. Physical and mental health in patients and spouses after intensive care of severe sepsis: a dyadic perspective on long-term sequelae testing the Actor-Partner Interdependence Model. *Crit Care Med*, 41 (1):69-75.
- Rosi S, Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Esparza EE, Larkin PB, Fike JR, Wenk GL, Barnes CA. 2009. Accuracy of hippocampal network activity is disrupted by neuroinflammation: rescue by memantine. *Brain*, 132 (Pt 9):2464-2477.

- Rossi C, Angelucci A, Costantin L, Braschi C, Mazzantini M, Babbini F, Fabbri ME, Tessarollo L, Maffei L, Berardi N, Caleo M. 2006. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci*, 24 (7):1850-1856.
- Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. 2005. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat*, 30 (2-3):144-157.
- Siesjo BK, Agardh CD, Bengtsson F. 1989. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1 (3):165-211.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. 2016. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama*, 315 (8):801-810.
- Solomkin JS, Mazuski JE, Bradley JS, Rodvold KA, Goldstein EJ, Baron EJ, O'Neill PJ, Chow AW, Dellinger EP, Eachempati SR, Gorbach S, Hilfiker M, May AK, Nathens AB, Sawyer RG, Bartlett JG. 2010. Diagnosis and management of complicated intra-abdominal infection in adults and children: guidelines by the Surgical Infection Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 50 (2):133-164.
- Spencer-Segal JL, Waters EM, Bath KG, Chao MV, McEwen BS, Milner TA. 2011. Distribution of phosphorylated TrkB receptor in the mouse hippocampal formation depends on sex and estrous cycle stage. *J Neurosci*, 31 (18):6780-6790.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (9):4350-4354.
- Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. 2008. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med*, 34 (9):1724-1731.
- Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, Francois B, Martin-Loeches I, Lipman J, Reinhart K, Antonelli M, Pickkers P, Njimi H, Jimenez E, Sakr Y. 2014. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med*, 2 (5):380-386.
- Vorhees CV, Williams MT. 2014. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. *Neurotoxicol Teratol*, 45:75-90.
- Walf AA, Frye CA. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*, 2 (2):322-328.

- Wartman BC, Holahan MR. 2014. The impact of multiple memory formation on dendritic complexity in the hippocampus and anterior cingulate cortex assessed at recent and remote time points. *Front Behav Neurosci*, 8:128.
- Weberpals M, Hermes M, Hermann S, Kummer MP, Terwel D, Semmler A, Berger M, Schafers M, Heneka MT. 2009. NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. *J Neurosci*, 29 (45):14177-14184.

## 8. Anhang

### 8.1 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer Prof. Dr.med. Christian Geis für die interessante Fragestellung und die Betreuung des vorliegenden Projekts bedanken. Bei auftretenden Problemen im Verlauf der Arbeit nahm er sich trotz aller Verpflichtungen immer Zeit, das weitere Vorgehen mit mir zu diskutieren.

Als nächstes gilt mein Dank Dr.rer.nat. Benedikt Grünewald für die Einführung sowohl in die Techniken der Forschung am Tiermodell, der Immunhistochemie und der Elektrophysiologie als auch in das wissenschaftliche Arbeiten im Allgemeinen.

Bei Holger Haselmann möchte ich mich für die vielen Male bedanken, die er mir kurzfristig im Laboralltag praktisch zur Hand ging. Mein herzlicher Dank geht auch an Claudia Sommer für das Einarbeiten in die Techniken der Gewebefärbung sowie für die Unterstützung beim Anfertigen der Western Blots und Golgi-Färbungen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern dafür bedanken, dass sie mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben und mir bei der Ausgestaltung meiner Ausbildung stets alle Freiräume gelassen haben.



## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1- Beispiel eines Enrichment-Käfigs .....	17
Abbildung 2- Unterteilung der Testfläche des Open Field-Tests .....	21
Abbildung 3- Unterteilung der Testapparatur des EPM .....	22
Abbildung 4- Unterteilung des Wasserbeckens beim MWM .....	22
Abbildung 5 – Mittels Golgi-Färbung dargestellte Verästelung eines hippocampalen Neurons der CA1-Region, Maßbalken 20 $\mu\text{m}$ , Vergrößerung 40fach .....	28
Abbildung 6- Schematische Darstellung der morphologischen Spinetypen .....	29
Abbildung 7- Schema zur Positionierung der Stimulationselektrode (Stim) in der CA3-Region und der Ableitelektrode (Rec) in der CA1-Region des Hippocampus; mit freundlicher Genehmigung von H.Haselmann .....	36
Abbildung 8- Ergebnisse des Open Field-Tests .....	38
Abbildung 9- Ergebnisse des EPM .....	38
Abbildung 10- Lernkurve des MWM, Zum Auffinden der Plattform benötigte Zeit in Sekunden an den einzelnen Versuchstagen .....	41
Abbildung 11- Ergebnisse der Probe Trails an Tag 8 und Tag 15 des MWM .....	42
Abbildung 12- Auswertung der Dichte der Mikroglia und Astrozyten im Hippocampus [ $1/\mu\text{m}^2$ ] .....	38
Abbildung 13- (A): Immunfluoreszenz-Färbung der Mikroglia-Zellen in der CA1-Region des Hippocampus mittels IBA-Antikörper, Maßbalken 200 $\mu\text{m}$ , Vergrößerung 20fach, (B): Vergrößerter Bildausschnitt aus (A), Darstellung der einzelnen angefärbten Zellen und ihrer Verästelungen .....	43
Abbildung 14- (A): Immunfluoreszenz-Färbung der Astrozyten in der CA1-Region des Hippocampus mittels GFAP-Antikörper, Maßbalken 200 $\mu\text{m}$ , Vergrößerung 20fach, (B): Vergrößerter Bildausschnitt aus (A), Darstellung der einzelnen angefärbten Astrozyten und ihrer Verästelungen .....	45
Abbildung 15- Auswertung der Dichte und Länge der dendritischen Spines .....	46
Abbildung 16- Vergleich der dendritischen Spines an hippocampalen CA1-Neuronen, Maßstab 200 $\mu\text{m}$ , Vergrößerung 60fach .....	47
Abbildung 17- Dichte der jeweiligen morphologisch unterscheidbaren Unterformen an synaptischen Spines [ $1/\mu\text{m}$ ] .....	48
Abbildung 18- Auswertung des ARC-Antikörper-Western Blots, densitometrische Messung der Banden .....	49

Abbildung 19 - Exemplarische Darstellung der gemittelten EPSP-Spur; schwarz: Baseline, rot: nach LTP-Induktion .....	50
---	----

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1- Tabelle zur Beurteilung des clinical severity scores .....	17
Tabelle 2- Protokoll zum Einsetzen der Tiere beim MWM .....	21
Tabelle 3- Im Methodenteil verwendete Lösungen mit Abkürzungen und Zusammensetzungen.....	23
Tabelle 4- Ergebnisse des MWM: Zeit der zum Auffinden der Plattform benötigten Zeit an den Versuchstagen und Signifikanzen (n.s.= nicht signifikant) .....	40

#### 8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr.med. Christian Geis,

Dr.rer.nat. Benedikt Grünewald

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.